



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**  
**Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia**

## **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA Y LABORATORIO**

**2018**

# **QUÍMICA BIOLÓGICA**

## **LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

Profesores:

Dra. Ana Cecilia Anzulovich (Prof. responsable)

Dra. Alicia Susana Molina (Prof. colaboradora)

Responsable de Trabajos Prácticos:

Dra Ethelina Cargenlutti (JTP)

Lic. M. Gabriela Plateo (Auxiliar)

**CRONOGRAMA DE TEORIAS Y TRABAJOS PRÁCTICOS**  
**Lic. en Biotecnología - 2018 – Primer Cuatrimestre**

HORARIO TEORÍA: LUNES 18,00 – 20,00 h. (Aula 43) y JUEVES 18,00-20,00 h (Aula 37)

HORARIOS DE T.P. DE AULA: MIÉRCOLES 14,00 -16,00 (Aula del lab. de Qca. Biológica).

HORARIOS DE TP DE LABORATORIO: LUNES 15,00-18,00 h.

**MARZO**

**TEMAS**

LUNES 12	INSCRIPCIONES
JUEVES 15	METABOLISMO. ENZIMAS I (BOL 1)
LUNES 19	ENZIMAS II. ENZIMAS DE OXIDOREDUCCION. (CONT. BOL 1)
MIÉRCOLES 21	<b>TP AULA N° 1: Enzimas</b>
JUEVES 22	CADENA RESPIRATORIA (BOLILLA 2)
LUNES 26	TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO (CONT. BOLILLA 2) <b>TP LAB N° 1: Estudio de la Actividad Enzimática de la Invertasa de la Levadura. Influencia del pH y la Temperatura.</b>
MIÉRCOLES 28	Sin actividad
JUEVES 29	FERIADO (Jueves de Semana Santa)

**ABRIL**

LUNES 2	FERIADO (Día del Veterano y de los Caídos en la Guerra de Malvinas)
MIÉRCOLES 4	<b>TP AULA N° 2: Transporte Electrónico. Fosforilación Oxidativa.</b>
JUEVES 5	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN (BOLILLA 3).
LUNES 9	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. VIA GLICOLÍTICA. (BOLILLA 3) <b>TP LAB N° 2: Transporte Electrónico Mitocondrial.</b>
MIÉRCOLES 11	<b>TP AULA N° 3: Hidratos De Carbono (PARTE I)</b>
JUEVES 12	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. CICLO DE KREBS. (BOLILLA 4)
LUNES 16	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. VIA DE LAS PENTOSAS (CONT. BOLILLA 5). <b>TP LAB N° 3: Efecto Pasteur</b>
MIÉRCOLES 18	<b>PRIMER PARCIAL (ENZIMAS. CADENA RESPIRATORIA)</b>
JUEVES 19	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. GLUCONEOGÉNESIS

---

LUNES 23 BIOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS. METABOLISMO DE GLUCÓGENO Y ALMIDÓN. (BOLILLA 5)  
**TP LAB N° 4: Determinación de Ácido cítrico**

**MIÉRCOLES 25 PRIMERA RECUPERACIÓN PARCIAL 1**

JUEVES 26 FOTOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS EN VEGETALES (CONT. BOLILLA 5)

LUNES 30 FERIADO (Puente turístico)

### **MAYO**

**MIÉRCOLES 2 TP AULA N° 4: Hidratos De Carbono (PARTE II)**

JUEVES 3 FERIADO PROVINCIAL

LUNES 7 FOTOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS EN VEGETALES (CONT BOLILLA 5)

MIÉRCOLES 9 Sin actividad

JUEVES 10 FERIADO (Día de la UNSL)

LUNES 14 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS. (BOLILLA 6).

**MIÉRCOLES 16 SEGUNDO PARCIAL. (METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO)**

JUEVES 17 DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS-CICLO DEL GLIOXILATO (CONT BOLILLA 6).

LUNES 21 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS 1 (BOLILLA 7)

MIÉRCOLES 23 **TP AULA N° 5: Metabolismo de Lípidos.**

JUEVES 24 BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS (BOLILLA 7)

LUNES 28 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS- (CONT. BOLILLA 8)  
**TP LAB N° 5: Metabolismo de lípidos.**

**MIÉRCOLES 30 PRIMERA RECUPERACIÓN PARCIAL 2**

JUEVES 31 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (BOLILLA 8) .

### **JUNIO**

LUNES 4 METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS (BOLILLA 9)

**MIÉRCOLES 6 TERCER PARCIAL (METABOLISMO DE LÍPIDOS)**

JUEVES 7 INTERRELACIONES METABÓLICAS (BOLILLA 11)

LUNES 11 INTERRELACIONES METABÓLICAS (CONT. BOLILLA 10).

**MIÉRCOLES 13 TP AULA N°6: metabolismo de aminoácidos y nucleótidos**

---

JUEVES 14	<b><i>PRIMERA RECUPERACIÓN PARCIAL 3.</i></b>
LUNES 18	<b><i>CUARTO PARCIAL (METAB. DE AMINOÁCIDOS, NUCLEÓTIDOS)</i></b>
MIÉRCOLES 20	FERIADO (Paso a la Inmortalidad del Gral. Manuel Belgrano)
JUEVES 21	INTERRELACIONES METABÓLICAS E INMUNOQUÍMICA (EXPOSICIÓN DE PROBLEMAS. SOLO ALUMNOS PROMOCIONALES).
LUNES 25	<b><i>PRIMERA RECUPERACIÓN PARCIAL 4 y SEGUNDA FECHA DE RECUPERACION DE PARCIALES.</i></b>
MIÉRCOLES 27	<b><i>RECUPERACIÓN DE PARCIALES</i></b>
JUEVES 28	

---

**REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES****ALUMNOS REGULARES**

1. Para el cursado de la asignatura el alumno deberá haber aprobado los cursos de Introducción a la Biotecnología y Biología General; y regularizado los cursos de Química de Biomoléculas y Fisicoquímica.
  2. Los alumnos conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura. Además, en la presente guía se encuentra adjunto el cronograma de actividades.
  3. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se desarrollará en las clases teóricas, así como en la guía de trabajos prácticos.
  4. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.
  5. Los conocimientos del alumno sobre la fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos, serán evaluados antes, durante, o al final del desarrollo de los mismos.
  6. Cada alumno llevará un cuaderno o carpeta en el que consignará los resultados y observaciones, a la manera de informe de los Trabajos Prácticos realizados. Al final de cada jornada el Jefe de Trabajos Prácticos podrá revisar y constatar los resultados obtenidos.
  7. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos el alumno deberá obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente las preguntas y cuestionarios de trabajos prácticos. Para ser considerado alumno regular en el curso deberá aprobar las Evaluaciones Parciales programadas y haber asistido al menos al 60% de las clases teóricas.
  8. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) los alumnos deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de las Evaluaciones Parciales sobre los mismos.
  9. Los horarios de comienzo de los Trabajos Prácticos están pautados con suficiente anticipación para que el alumno los conozca, por lo tanto, deberá llegar en horario y no existirá tolerancia respecto a las tardanzas. En el caso que un alumno ingrese al Trabajo Práctico después del comienzo del mismo, implicará un ausente en el cuestionario y deberá recuperar dicho práctico.
  10. Por las mismas reglamentaciones, los alumnos tendrán dos (2) oportunidades de recuperación de los Trabajos Prácticos de aula, debiendo aprobar en primera instancia el 75% (o su fracción menor) completando la aprobación del noventa por ciento (90%) en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos.
  11. Para poder rendir cada evaluación parcial, los alumnos deberán tener aprobado el cien por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en la misma. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el **65%** del puntaje total.
-

12. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas recuperaciones se aprobarán con el **75%** del puntaje total.

### **ALUMNOS CON PROMOCION SIN EXAMEN FINAL**

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por Promoción sin examen final. Para acceder a dicha Promoción los alumnos deberán:

- 1-** En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura. Las materias que deberán estar aprobadas son: Química de Biomoléculas y Fisicoquímica
- 2-** Para mantener la condición de alumno promocional deberá cumplir, como mínimo, con la asistencia al ochenta por ciento (**80%**) de las actividades teóricas programadas.
- 3-** Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los alumnos regulares
- 4.** Evaluaciones y recuperaciones: Se realizarán evaluaciones parciales de la totalidad del programa teórico y de Trabajos Prácticos.
- 5.** Cada evaluación será escrita u oral, según la naturaleza del tema. Para aprobar cada evaluación parcial se requiere el 70% del puntaje total. Las evaluaciones se calificarán con una nota, en la escala del 1 (uno) al 10 (diez). Para aprobar se requerirá un mínimo de 7 (siete) puntos
- 6-** Aprobar una evaluación adicional, de modalidad oral, sobre el tema de Integración Metabólica.
- 7-** Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.
- 8-** Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.

---

## NORMAS DE BIOSEGURIDAD QUE EL ALUMNO DEBERA CUMPLIR PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

### Riesgo Biológico

La manipulación o exposición a los agentes biológicos puede traer como consecuencia la infección del personal expuesto, con o sin manifestación de la enfermedad. En el hombre, el riesgo de infección es el más significativo (por la frecuencia e importancia) y el más antiguo de los reconocidos por los profesionales de la salud. Entre las causas atribuidas a las infecciones del personal de laboratorio se destacan: el uso de objetos punzo-cortantes contaminados con fluidos corporales, los derrames o salpicaduras, el trabajo con animales de laboratorio, no tomar las adecuadas medidas de protección, etc.

### Reglas críticas de higiene y seguridad

Al formarse como profesional, debe tener en cuenta una serie de normas, que contribuirán a llegar a resultados exactos, a un correcto desempeño en las actividades a desarrollar en un laboratorio, y al cuidado de la salud en el ambiente de trabajo.

Las normas de seguridad están hechas para la protección de su vida, por lo tanto, su cumplimiento es **OBLIGATORIO**. A saber:

- 1) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia no deben estar obstruidas.
  - 2) El **uso del guardapolvo y guantes de látex es obligatorio** dentro del laboratorio. El uso de barbijo y lentes es obligatorio en el trabajo práctico que lo requiera.
  - 3) No se permitirá la entrada a los laboratorios con pantalones cortos, chinelas o cabello largo suelto.
  - 4) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
  - 5) Deberá mantener su mesada y pileta limpias. Para ello a cada trabajo práctico debe traer una rejilla o repasador limpio.
  - 6) Al comenzar el trabajo práctico, todo el material debe estar limpio y seco para evitar inexactitudes.
  - 7) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
  - 8) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) utilice guantes, debe considerarlo material infecto contagioso.
  - 9) Las puntas plásticas o tips y pipetas, luego de ser utilizados, deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. No los deje apoyados sobre la mesada.
  - 10) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use una pera o pro-pipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, avise de inmediato al personal docente.
  - 11) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la **ducha** y lave la zona afectada con abundante agua, si los afectados son los ojos use el **lavaojos** y lávelos durante 15 minutos luego solicite primeros auxilios.
  - 12) Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse **bajo la campana extractora sin excepción**.
-

13) En caso de derrame de ácidos o solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin, ubicado en nuestro laboratorio, en la mesa lateral.

14) Dilución de ácidos: Cuando realice la dilución de un ácido proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. **Nunca añadir agua al ácido** (*no se debe bañar el ácido*).

15) Uso y Tratamiento de reactivos y soluciones químicas:

a- Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y **lea bien su etiqueta**. Si es transferido a otro recipiente, **rotúlelo de nuevo**.

b- Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.

c- No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.

d- **No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.**

e- Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, **nunca lo haga con la mano**.

f- Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.

g- Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. **No dirigir la boca del tubo** hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.

h- Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.

i- Algunos desperdicios líquidos podrán desecharse en las piletas de descarga con un rango pH moderado de 6-8, dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos. Soluciones alejadas de estos pH deberán primero **ser neutralizadas antes de desecharlas**.

16) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes **deberán desecharse en los recipientes con bolsas rojas** destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.

17) Con respecto al Trabajo Práctico: Luego de finalizado el trabajo práctico, lave el material, enjuáguelo con agua destilada y déjelo secar.

18) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrífugas, medidor de pH, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.

19) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el laboratorio **no corra, camine**.



# **TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA**

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 1

### ENZIMAS

#### OBJETIVO GENERAL

- Comprender la cinética enzimática y mecanismos de regulación.

#### Objetivos operacionales:

- Describir las propiedades generales de las enzimas.
- Determinar gráficamente los valores de Km.
- Interpretar la acción de distintos tipos de inhibidores sobre la actividad enzimática.

#### INTRODUCCION

Las enzimas catalizan prácticamente todas las reacciones biológicamente importantes. Se encuentran entre las más notables biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico. Una reacción catalizada por una enzima se puede esquematizar:



La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores y condiciones requeridos para la reacción. Para que la determinación de actividad enzimática guarde relación con la cantidad de enzima presente en solución, es necesario medir la velocidad inicial, entendiéndose como aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante, en relación con el sustrato total presente de la mezcla.

Para medir la actividad de una preparación enzimática en solución se utilizan distintas expresiones:

La cantidad de enzima se indica habitualmente en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad** de cualquier **enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ( $1\mu\text{mol} = 10^{-6}\text{mol}$ ) de sustrato por minuto, en condiciones definidas de pH y temperatura.

	μmol de Sustrato Transformado
<b>Unidad de Enzima</b> =	_____
	min

La **actividad específica** indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática no ya al volumen de la muestra, sino al total de proteínas existentes en la misma.

	μmol de Sustrato Transformado/min. (Unidad de enzima)
<b>Actividad Específica</b> =	_____
	mg de proteínas

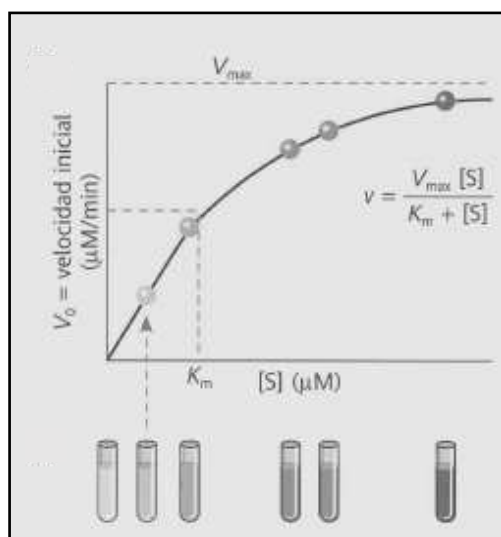
El incremento de la actividad específica indica la eliminación de proteínas que no poseen la acción catalítica perseguida. La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima en solución, se encuentra al estado puro.

Cuando se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su **actividad molar** o **número de recambio**, que corresponde al número de moléculas (o moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (o mol) de enzima, trabajando en condiciones de saturación de sustrato, lo que corresponde a la velocidad máxima en presencia de un mol de enzima.

$$\text{Número de Recambio} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/ min}}{\text{mol de enzima}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, y ellos deben ser considerados al momento de determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre dichos factores se encuentran: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores, la presencia de inhibidores, entre otros.**

Si se mide la actividad de una enzima a diferentes concentraciones de sustrato, inicialmente cuando las concentraciones de sustrato son bajas, la actividad aumenta rápidamente con los incrementos en la concentración de sustrato, pero a niveles más elevados de sustrato, el incremento de la velocidad enzimática comienza a ser más lento, tendiendo a alcanzar un valor de actividad máximo, que no es superado a pesar de que se continúe incrementando la concentración de sustrato. Este comportamiento queda expresado en la siguiente gráfica:



**Figura 1.1.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima. Vo: velocidad inicial. Km: constante de Michaelis-Menten. Vmáx: velocidad máxima. [S]: concentración de sustrato. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 1° Ed.

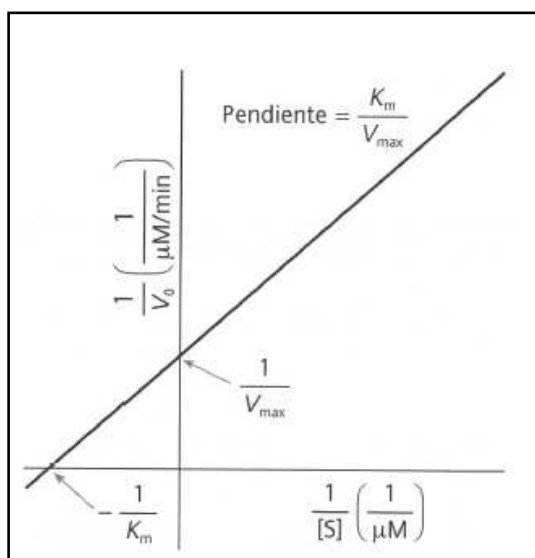
Michaelis y Menten establecieron una relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato mediante una constante llamada  $K_m$  (constante de Michaelis Menten), y dedujeron que la hipérbola que corresponde a la curva de saturación de una enzima por su sustrato, puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\text{máx.}} [S]}{K_m + [S]}$$

Se puede definir  $K_m$  como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. En condiciones definidas de medio de reacción, pH, temperatura, etc., el valor de  $K_m$  permanece fijo para cada sustrato de una misma enzima, se expresa en unidades de concentración, y permite caracterizarla.

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de  $K_m$ . Un ejemplo de ello es la ecuación de Lineweaver-Burk, que es la recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten, y corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$



**Figura 1.2.** Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk. [S]: concentración de sustrato;  $v_0$ : velocidad enzimática;  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten;  $V_{\text{máx}}$ : velocidad máxima. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 1º Ed.

Además, de la concentración de sustrato, el valor de pH en solución, la temperatura, la presencia de cofactores, etc., la actividad de las enzimas intracelulares puede ser regulada por varios mecanismos. En casi todas las vías metabólicas existen una o más enzimas que actúan como reguladoras que pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas.

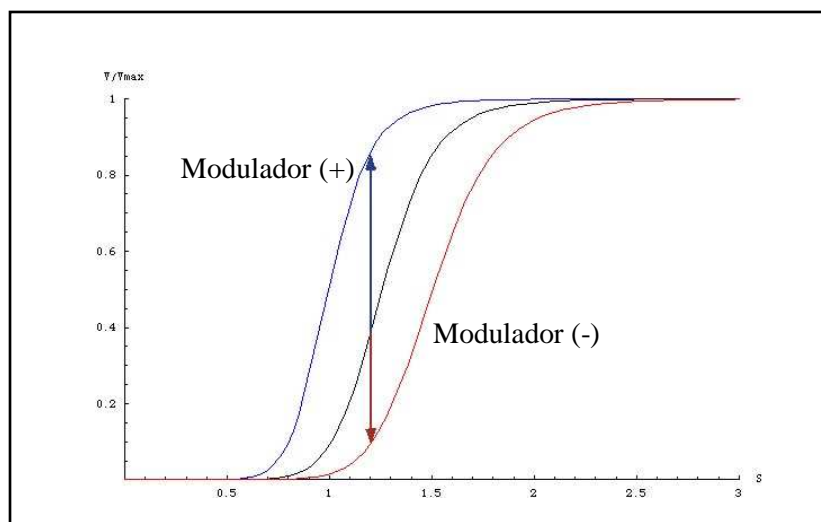
Existen varios mecanismos de regulación de las reacciones enzimáticas:

- a) Los que modifican la actividad de las enzimas:
  - Enzimas alostéricas
  - Enzimas reguladas por modificación covalente
  - Enzimas reguladas por modificación proteolítica: zimógenos
  - Enzimas reguladas por compartimentalización celular: Isoenzimas
- b) Los que regulan la cantidad de enzima presente:
  - Inducción o represión de la síntesis de enzimas.
  - Degradación proteolítica de la proteína enzimática

#### **- Enzimas alostéricas**

A diferencia de las enzimas “michaelianas”, las enzimas alostéricas no poseen una cinética de tipo hiperbólica, sino que la representación de la actividad de estas enzimas, en función de la concentración de sustrato ( $[S]$ ), responde a una curva sigmoidea. Este comportamiento cinético se debe al efecto cooperativo de las moléculas de sustrato, esto es, cuando se unen las primeras moléculas de S al sitio activo, hacen que cambie la conformación de la enzima y se favorezca la unión de más moléculas de sustrato, esto hace que, en ese momento, se dispare la velocidad de reacción hasta que se saturan todos los sitios catalíticos y se alcanza la velocidad máxima de la reacción.

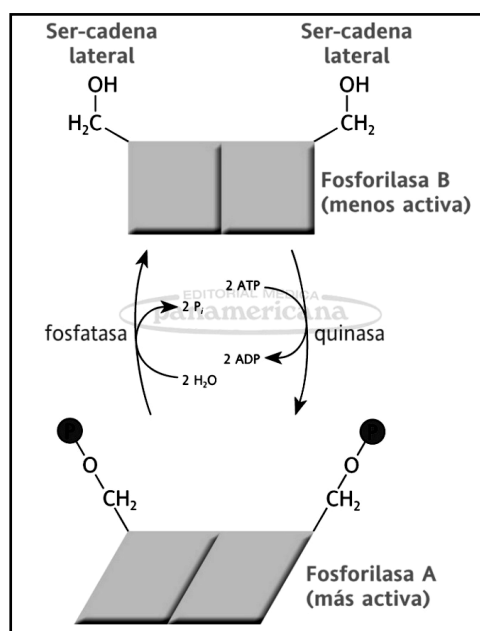
Por otro lado, en la estructura molecular de las enzimas alostéricas, además del sitio catalítico, existen otros sitios denominados reguladores, a los cuales se unen específicamente moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre la actividad enzimática. Estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos y pueden actuar de modo positivo o negativo. Las enzimas alostéricas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas, entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que permite que cuando un modulador positivo o negativo se une a ellas, ocurra un cambio de conformación que se transmite a las otras subunidades, de manera tal que se favorece o impide la unión del sustrato al sitio activo, según se trate de un modulador positivo o negativo, respectivamente (ver figura 1.3).



**Figura 1.3.** Curvas de actividad de enzimas alostéricas en función de la concentración de sustrato ([S]). Efectos de un modulador positivo (+) y negativo (-) sobre la actividad de una enzima alostérica.

### - Enzimas reguladas por modificación covalente

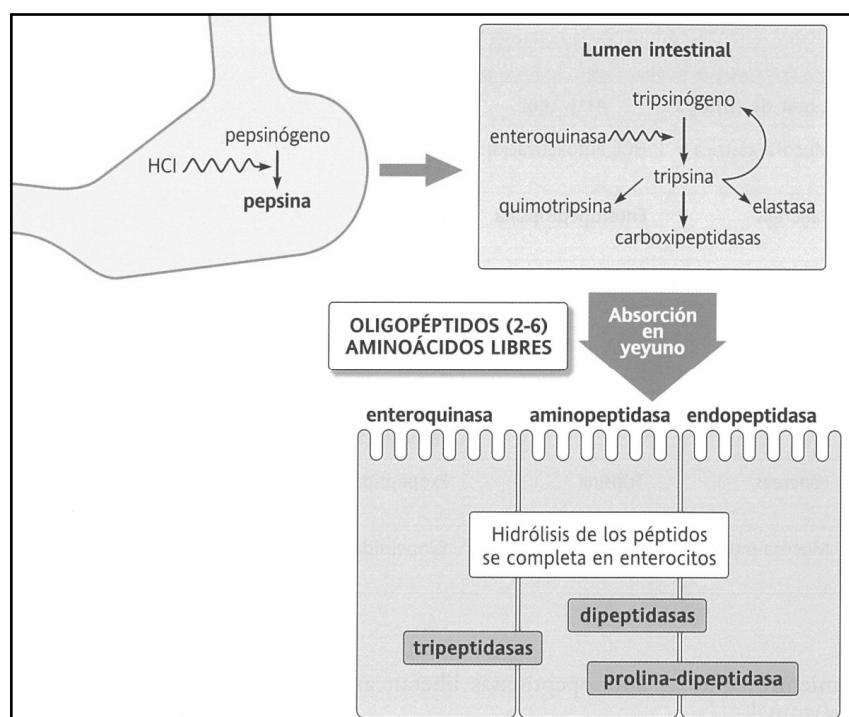
Estas enzimas regulan su actividad por la unión o sustracción de grupos unidos covalentemente como el caso de grupos fosfatos. La enzima “glucógeno fosforilasa”, presente en músculo e hígado, se encuentra en un estado de baja actividad llamado fosforilasa b, la cual es convertida en fosforilasa a, conformación activa, mediante la adición de restos de fosfato a hidroxilos de residuos de serina. Es decir que la actividad de estas enzimas es modulada por la inserción covalente de fosfatos, principalmente, como se muestra en el esquema a continuación:



**Figura 1.4.** Esquema de la modificación covalente de la enzima “glucógeno fosforilasa”. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. “Bioquímica. Conceptos esenciales”. 1° Ed.

### - Enzimas reguladas por modificación proteolítica: zimógenos

Ciertas enzimas son producidas en las células de origen como precursores inactivos llamados zimógenos, proenzimas o preenzimas. La mayoría de estos precursores son proteínas simples que se convierten en enzima activa por un proceso de hidrólisis. Ejemplos de zimógenos son algunos componentes de los jugos digestivos, los cuales se activan al llegar a la luz intestinal. Así, el pepsinógeno en presencia de la acidez del estómago se convierte en pepsina, la enzima activa; el tripsinógeno, secretado por el páncreas, se hidroliza por la enteroquinasa a tripsina, la enzima activa.



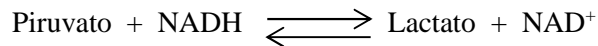
**Figura 1.5.** Esquema del proceso de activación zimógenos. Feduchi, “Bioquímica. Conceptos esenciales”, 1° Ed.

### Enzimas reguladas por compartimentalización celular: Isoenzimas

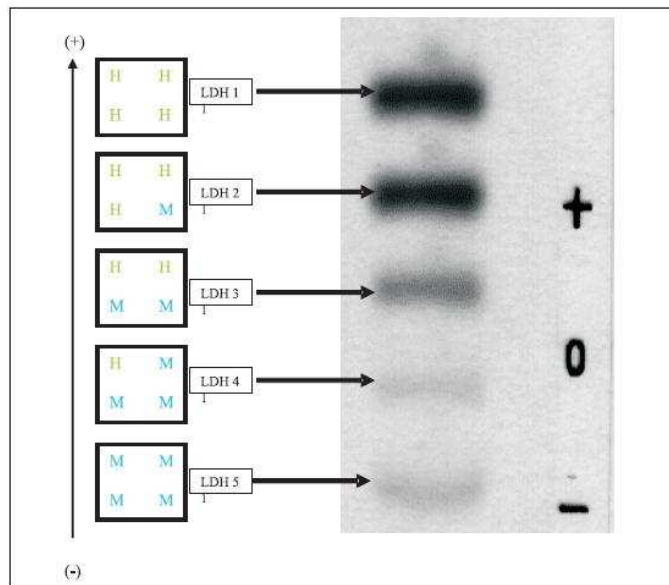
Son diferentes formas moleculares de una misma enzima. Las isoenzimas tienen igual especificidad de sustrato y diferente afinidad, es decir presentan distintos valores de  $K_m$  y  $V_{máx}$ . Un ejemplo de isoenzimas son la hexoquinasa y la glucoquinasa (isoenzima IV de la primera). Ambas, utilizan como sustrato a glucosa con un  $K_m$  de 0,1 mM y 10 mM, respectivamente. La reacción que catalizan es la siguiente:



Debido a que poseen diferente estructura aminoacídica, por lo tanto, distinto peso molecular (PM) y/o carga, las isoenzimas se pueden separar por electroforesis en gel. En este sentido, una de las mejores estudiadas es la “lactato deshidrogenasa”, que presenta cinco isoenzimas cada una con una composición aminoacídica diferente. El sustrato de la misma es el piruvato o el lactato. La reacción que catalizan es la siguiente:



La distribución relativa de la actividad enzimática entre las cinco formas es característica para cada tejido dependiendo de la función del mismo.



**Figura 1.6.** Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH).

### Inhibidores enzimáticos

Existen agentes químicos que inhiben reversible o irreversiblemente la acción catalítica de las enzimas.

La inhibición reversible puede ser: Competitiva y No Competitiva.

Los **inhibidores competitivos** aumentan el valor de  $K_m$ , pero no modifican la  $V_{máx}$  de la enzima. El inhibidor presenta similitud estructural con el sustrato y ambos compiten por el sitio activo de la enzima.

Los **inhibidores no competitivos** son compuestos que se unen a la enzima en un lugar diferente al sitio activo y provocan una disminución de la  $V_{máx}$  sin modificar  $K_m$ .

Estas inhibiciones se pueden representar gráficamente sobre la curva de  $V_i$  en función (S) y su inversa, la ecuación de Lineweaver-Burk.



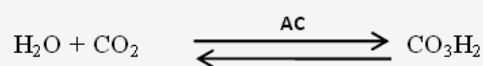
**PROBLEMAS DE APLICACION**

1) Un investigador descubre y purifica una enzima nueva generando la siguiente tabla de purificación:

Procedimiento	Proteína total (mg)	Actividad (Unidades)
Extracto crudo	20.000	4.000.000
Precipitación (sal)	5.000	3.000.000
Precipitación (pH)	4.000	1.000.000
Cromatografía de intercambio iónico	200	800.000
Cromatografía de tamaño	45	675.000

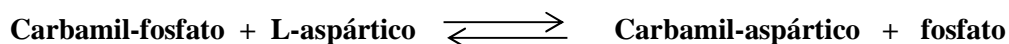
- De la información dada en la tabla calcular la actividad específica de la solución enzimática después de cada procedimiento de purificación.
- ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con esta enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento en pureza)?
- ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?

2) La anhidrasa carbónica (AC) presente en los glóbulos rojos, se halla entre las enzimas conocidas más activas. Posee un PM de 30.000 y cataliza la hidratación reversible del CO<sub>2</sub>, reacción importante en el transporte del CO<sub>2</sub> desde los tejidos hasta los pulmones.



Si 10 µg de anhidrasa carbónica pura catalizan la hidratación de 0.30 g de CO<sub>2</sub> en 1 minuto a 37 °C, en las condiciones óptimas, calcúlese el número de recambio de la enzima.

3) La enzima aspartato transcarbamilasa cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidina:

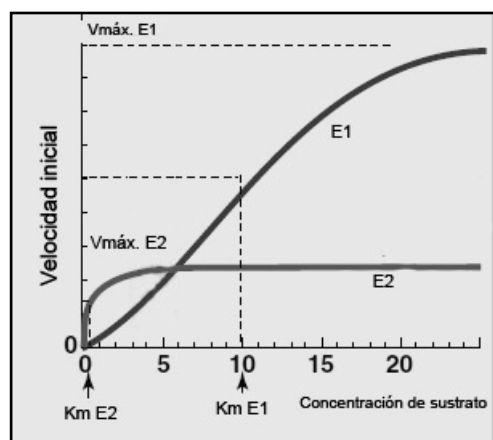


En un estudio cinético sobre esta enzima aislada de *E. coli* utilizando aspártico como sustrato, en presencia de CTP 0,5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

Aspártico (Molar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
1 x 10 <sup>-3</sup>	0,45	0,20
2 x 10 <sup>-3</sup>	0,80	0,40
3 x 10 <sup>-3</sup>	1,70	0,70
4 x 10 <sup>-3</sup>	2,90	1,00

$5 \times 10^{-3}$	3,40	1,40
$7 \times 10^{-3}$	4,30	2,40
$9 \times 10^{-3}$	5,10	3,70
$10 \times 10^{-3}$	5,30	4,20
$12 \times 10^{-3}$	5,60	4,80
$15 \times 10^{-3}$	5,80	5,50
$16 \times 10^{-3}$	5,80	5,60
$17 \times 10^{-3}$	5,80	5,60

- a) Sin utilizar ninguna representación gráfica estímesese el valor de  $K_m$ .
- b) Calcule este parámetro utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones? Justificar.
- c) ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.
- 4) En la siguiente gráfica se representa la actividad enzimática de las isoenzimas E1 y E2. De acuerdo a la misma responda:
- a) ¿Cuál de las dos isoenzimas poseen mayor afinidad por el sustrato?
- b) ¿Cuál de las dos isoenzimas alcanza la  $V_{m\acute{a}x}$  con una menor concentración de sustrato?



- 5) Una enzima que cataliza la reacción  $S \longrightarrow P$ , se ensaya con las siguientes concentraciones de sustrato, indicándose también las velocidades iniciales.

Concentración inicial de [S]. Molar	Velocidad inicial ( $\mu\text{mol} / \text{l min}$ )
$1 \times 10^{-2}$	75.0
$1 \times 10^{-3}$	74.9
$1 \times 10^{-4}$	60.0
$7.5 \times 10^{-5}$	56.25
$6.26 \times 10^{-6}$	15.0

- a) Determinar la  $K_m$  de la enzima y la  $V_{máx}$  que se pueden conseguir con la concentración de la enzima utilizada.
- b) ¿Cuál será la velocidad inicial con concentraciones de sustrato tales como:  $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$  o  $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ?
- c) ¿Cuál sería la velocidad inicial con una concentración inicial de  $[S] 10^{-4}$  si se duplica la concentración de enzima?

**6)** La glucógeno fosforilasa es una enzima que regula su actividad por modificación covalente de su molécula. Esta enzima actúa sobre el glucógeno liberando unidades de glucosa 1-fosfato. Cuando la glucógeno fosforilasa está fosforilada es activa (fosforilasa a) y cuando se defosforila es inactiva (fosforilasa b). Considerando este concepto, indique qué le ocurriría a la enzima en presencia de:

- a) Fosforilasa quinasa y ATP
- b) Fosforilasa fosfatasa
- c) Qué otra enzima del metabolismo del glucógeno se vería afectada y de qué manera, cuando actúan a o b.

## GUIA DE ESTUDIO

### Enzimas:

Clasificación. Cofactores enzimáticos.

Unidad de Enzima, Actividad Específica e Índice de Cambio.

Ecuación de Michaelis-Menten: Determinación gráfica de  $K_m$  y  $V_{máx}$ :

- ¿En qué condiciones se alcanza  $V_{máx}$ . en una reacción enzimática?
- ¿Qué importancia tiene la determinación del  $K_m$  de una enzima?

Ecuación de Lineweaver-Burk. Determinación de  $K_m$  y  $V_{máx}$ .

Definición de  $K_m$ . Su importancia. ¿Qué factores modifican su valor?

Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática.

Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.

Inhibición competitiva y no competitiva.

Representación gráfica de Lineweaver-Burk: diferencia entre un inhibidor competitivo y no competitivo:

- Complejos que se forman en presencia de un inhibidor competitivo y no competitivo.
- ¿Qué modificaciones presenta la pendiente y las intersecciones en cada tipo de inhibición?
- ¿Qué parámetros se modifican cuando actúan los dos tipos de inhibidores?
- 

### Isoenzimas:

Propiedades, composición,  $K_m$ , separación electroforética.

### Regulación metabólica.

#### 1- Enzimas alostéricas:

- ¿Qué entiende por retroinhibición?
- ¿Qué propiedades tiene una enzima alostérica?
- ¿Cuál es el comportamiento de la enzima alostérica frente a concentraciones crecientes de sustrato?
- ¿Dónde se une el modulador o efector y cómo se modifica la actividad enzimática?

#### 2- Modulación covalente

- ¿Cómo se realiza el proceso de regulación covalente?
- Ejemplifique con la enzima fosforilasa.

**Zimógenos:**

- ¿Son enzimas activas?
- ¿La activación de los zimógenos es irreversible? Explique por qué.

**Bibliografía**

BLANCO, A. "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, Bs. As, 2006. Reimpresión año 2007.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. y FERRIER D.R., "Bioquímica", Ed. Mac Graw- Hill Interamericana, 3° Edición. 2006.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, S.A., 4° Edición, 2006. Reimpresión año 2008.

FEDUCHI, E., BLASCO, I., ROMERO, C.S. y YÁÑEZ, E. "Bioquímica. Conceptos esenciales", Ed. Médica Panamericana, 2010.

---

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 2:

### TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

#### OBJETIVOS

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

#### INTRODUCCIÓN

En los organismos aeróbicos, las oxidaciones de sustancias provistas por los alimentos constituyen la principal fuente de energía utilizable para efectuar trabajo (síntesis químicas, transporte activo a través de membranas, locomoción, etc.).

En los organismos vivos, comúnmente las oxidaciones no se realizan por transferencia directa al oxígeno de los electrones provenientes de los sustratos, sino que se efectúan en etapas sucesivas a través de distintos aceptores de electrones de potencial de reducción creciente. De esta manera, la energía es liberada en forma fraccionada y puede ser captada y utilizada por las células.

Los aceptores de equivalentes de reducción antes mencionados forman complejos con enzimas que catalizan la transferencia de  $e^-$ , y se encuentran ubicados en la membrana interna mitocondrial, ordenados en un gradiente de potencial de reducción creciente. Este conjunto de complejos recibe el nombre de *cadena respiratoria* o *cadena de transporte electrónico*.

En las primeras etapas, del transporte electrónico se transfieren juntos dos protones y dos electrones del par de hidrógenos cedidos por un sustrato oxidado. Luego los protones quedan en el medio y sólo los electrones continúan su pasaje de un aceptor a otro hasta el aceptor final que es el oxígeno.

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas deshidrogenasas ligadas a NAD que oxidan sus sustratos generando  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , los equivalentes de reducción ( $\text{H} + e^-$ ) son cedidos por la coenzima a la cadena respiratoria, ésta última integrada por los siguientes componentes (figura 4.1 y 4.2):

a) *NADH-ubiquinona reductasa* (complejo I): contiene flavina mononucleótido (FMN) y 5 a 8 centros ferrosulfurados. Los equivalentes de reducción de NADH son captados por la coenzima FMN que se convierte en  $\text{FMNH}_2$ , a continuación, pasan  $e^-$  sucesivamente por los átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  de los centros Fe-S, que captan reversiblemente  $e^-$ . Luego los  $\text{H}^+$  y  $e^-$  son cedidos a la coenzima Q. Durante el pasaje de los electrones, se reoxidan el  $\text{FMNH}_2$  y los átomos de hierro de las proteínas Fe-S y se reduce la CoQ a  $\text{CoQH}_2$ .

b) *Succinato-ubiquinona reductasa* (complejo II): Este complejo utiliza como coenzima flavina adenina dinucleótido (FAD) y posee 3 centros Fe-S. Recibe dos equivalentes de reducción del succinato y los trasfiere a la Coenzima Q.

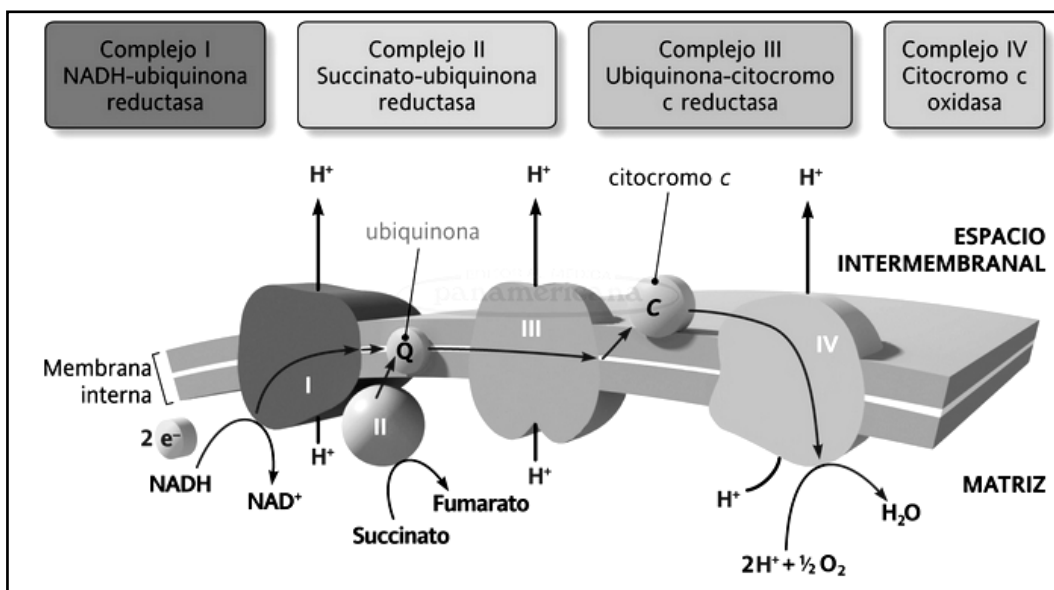
c) *Coenzima Q o ubiquinona*: Este es el único aceptor del sistema de transporte electrónico no unido a proteínas. Su larga cadena isoprenoide hidrófoba, le permite alojarse en la bicapa lipídica de la membrana y actuar en ella como un portador móvil de  $e^-$ . Recibe equivalentes de reducción que proceden tanto de sustratos oxidados por enzimas dependientes de NAD y transferidos a través del complejo NADH-ubiquinona reductasa, como también de sustratos oxidados por enzimas ligadas a FAD. La  $CoQH_2$  cede dos  $e^-$  al complejo ubiquinona-citocromo reductasa y deja dos protones libres en el medio.

d) *Ubiquinona-citocromo c reductasa* (complejo III): contiene los citocromos  $b_{566}$  y  $b_{562}$ ,  $c_1$  y un centro Fe-S. Los citocromos son hemoproteínas en las cuales el Fe del hemo capta reversiblemente un electrón. Desde la ubiquinona-citocromo reductasa los  $e^-$  son transferidos al citocromo c.

e) *Citocromo c*: es una hemoproteína ubicada sobre la cara exterior de la membrana interna mitocondrial y entrega electrones al complejo citocromo oxidasa. Es el único componente de la cadena que ha sido aislado.

f) *Citocromo oxidasa* (complejo IV): posee dos citocromos ( $a$  y  $a_3$ ) y dos átomos de Cu. Transfiere electrones al  $O_2$ . Una molécula de oxígeno capta 4  $e^-$  y se activa, uniéndose a  $4H^+$  para dar dos moléculas de  $H_2O$ .

En la etapa final de la cadena respiratoria, una molécula de oxígeno es reducida totalmente por 4  $e^-$ , la reducción parcial da lugar a la formación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales son tóxicos. La interacción entre  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  forma radicales hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), altamente activos. Los niveles de  $H_2O_2$  y radicales libres se mantienen muy bajos en los tejidos gracias a sistemas de defensa: enzimas como *superóxido dismutasa*, *catalasa* y *peroxidasas* (la primera cataliza la eliminación de  $O_2^-$  y las demás de  $H_2O_2$ ). Además de sistemas enzimáticos existen sustancias antioxidantes como el tocoferol o vitamina E y los carotenos (provitamina A).



**Figura 2.1.** Transporte de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones. Extraída de Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales".

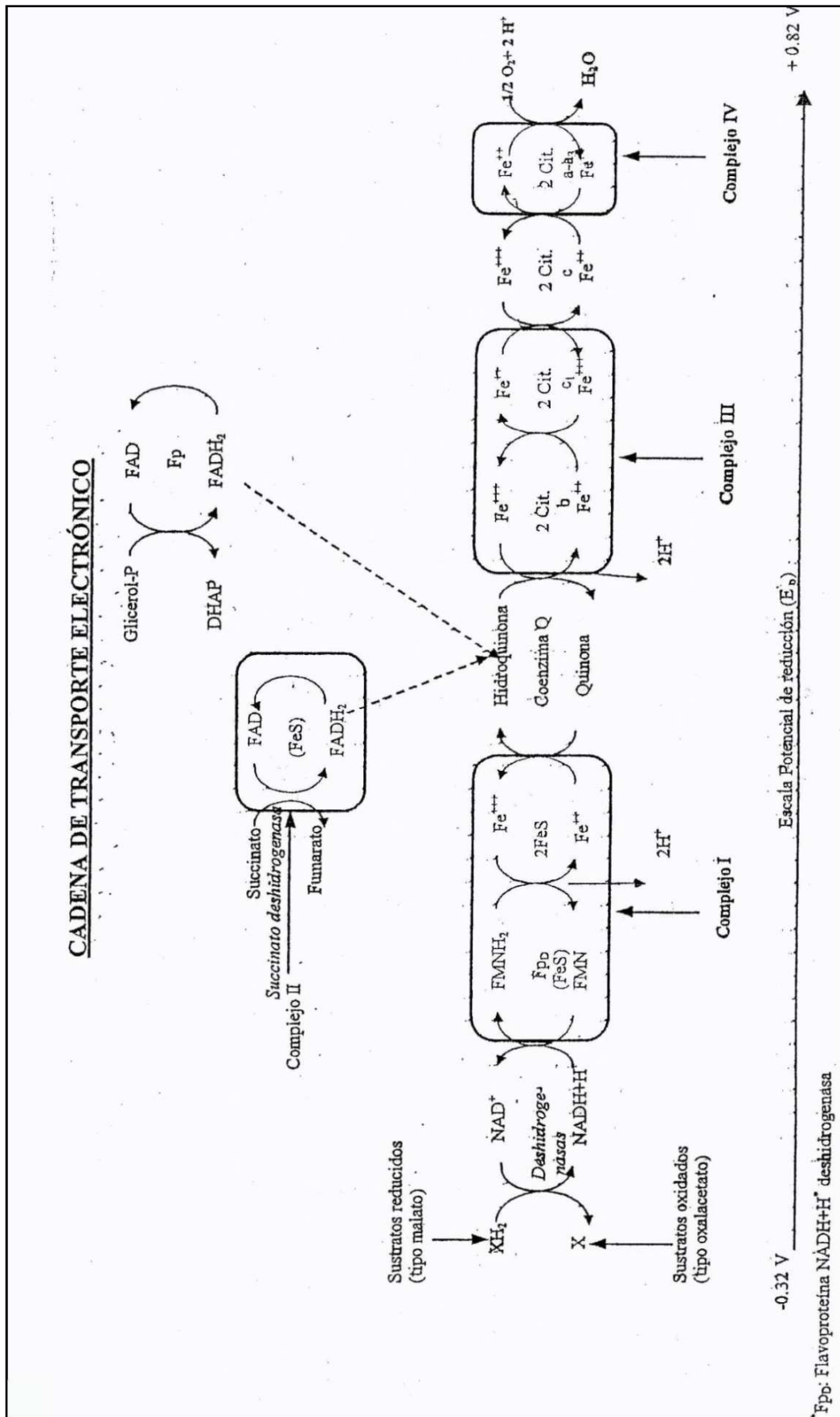


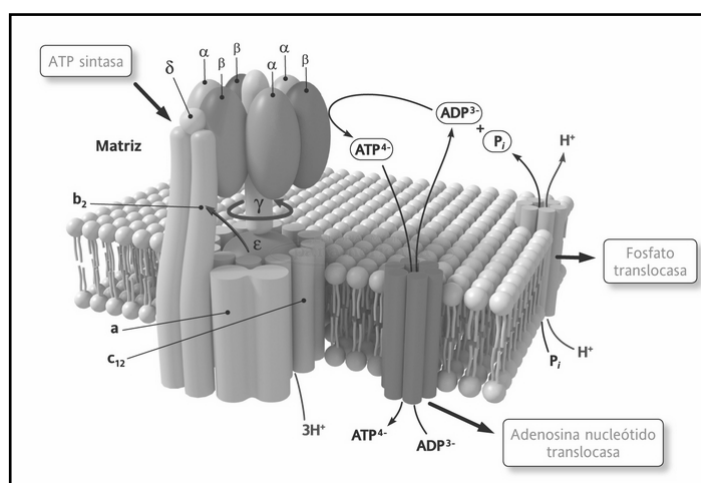
Figura 2.2. Esquema de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



## Fosforilación oxidativa

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química de enlaces de anhídrido de ácido del ATP. La síntesis de ATP mitocondrial se realiza principalmente, en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al ciclo de Krebs, principalmente como Acetil-CoA y también como otros intermediarios, los cuales al ser oxidados hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , producen a través de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (hidrógenos y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria hasta el oxígeno molecular, para formar agua.

La *fosforilación oxidativa* es el proceso en el cual se utiliza la energía liberada durante el transporte electrónico para la síntesis de ATP. La hipótesis quimiosmótica explica el mecanismo mediante el cual ocurre este proceso (figura 4.3): la energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar  $\text{H}^+$  al exterior de la matriz mitocondrial, formándose un gradiente de concentración y eléctrico. Cuando los  $\text{H}^+$  retornan a la matriz mitocondrial, solamente lo pueden hacer a través de la fracción  $\text{F}_o$  del complejo  $\text{F}_1\text{-F}_o$  (*ATP sintasa*), debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable a estos iones. Dos protones ingresan a través de la proteína  $\text{F}_o$  que provee un canal iónico a través de la bicapa lipídica y al llegar a la fracción  $\text{F}_1$ , se activa la ATP sintasa catalizando la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ).



**Figura 2.3.** Estructura de la ATP Sintasa, del translocador ATP/ADP y el simporter  $\text{P}_i/\text{H}^+$ . Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. “Bioquímica. Conceptos esenciales”.

## Relación fósforo/oxígeno (P/O)

La relación P/O se refiere al número de moléculas de ATP sintetizadas por moléculas de oxígeno consumido.

Esta relación surge a partir de experimentos en los cuales se medía el consumo de oxígeno y fósforo inorgánico ( $\text{P}_i$ ) por parte de mitocondrias en presencia de diferentes sustratos oxidables.

Cuando los sustratos utilizados son oxidados por deshidrogenasas NAD dependientes (ej.: malato), se estimó que la relación entre moléculas de fosfato y átomos consumidos (P/O) es igual a tres. Esto indicaría

que, por cada par de hidrógenos o electrones transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones, se unen tres moléculas de Pi a tres de ADP. En otras palabras, el flujo de un par de electrones permitiría la síntesis de tres moléculas de ATP.

Cuando se utilizaban sustratos oxidables por deshidrogenasas flavina dependientes (ej.: succinato), la relación P/O era igual a dos. La producción de ATP sería de dos moléculas por cada par de electrones transferidos.

Estas observaciones indicaban que uno de los sitios de producción de ATP estaba asociado a la NADH-ubiquinona reductasa, pues cuando los equivalentes de reducción ingresaban por otra vía

(FAD  $\longrightarrow$  CoQ), el rendimiento era menor en un ATP.

### Inhibidores del transporte electrónico y/o de la síntesis de ATP

Algunos agentes actúan inhibiendo la transferencia de electrones y, consecuentemente impidiendo la síntesis de ATP.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital	Insecticida neurobitúrico: induce el sueño	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la CoQ
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit. b a cit. c <sub>1</sub>
Cianuro Monóxido de carbono		Inhiben la citocromo oxidasa

Otros inhibidores bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, la oxidación también se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de la subunidad F <sub>0</sub> de la ATP sintasa

### Desacoplantes

Son compuestos que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, sin inhibir el flujo de electrones hacia el O<sub>2</sub>. Ejemplo: 2,4-dinitrofenol y dicumarol.

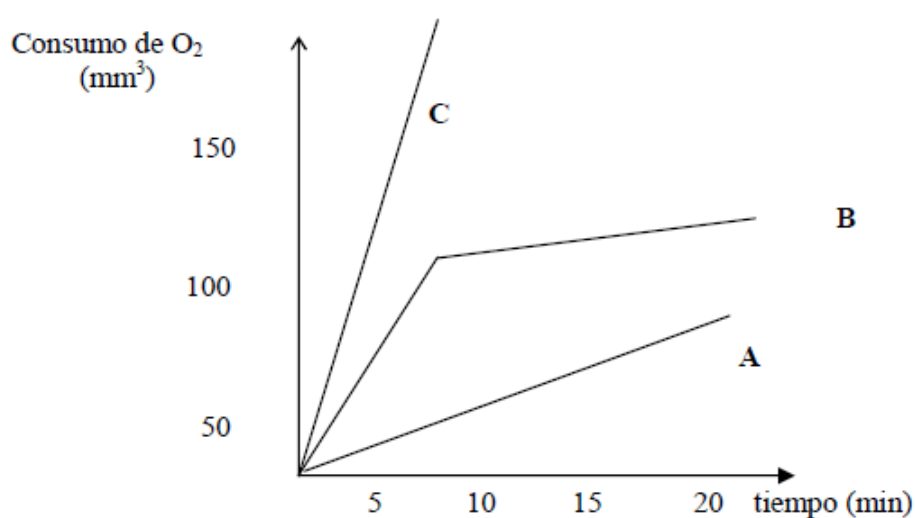
Estos agentes son sustancias **liposolubles** que disminuyen el gradiente de protones formado por el transporte electrónico, haciendo ingresar protones a la matriz mitocondrial a través de la membrana interna, comportándose como ionóforos de protones disipando la fuerza motriz - protónica y de esta manera inhiben la síntesis de ATP.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1)- El consumo de O<sub>2</sub> fue medido en tres vasos de Warburg que contenían lo siguiente:

VASO A	VASO B	VASO C
Mitocondrias de hígado de rata	Ídem A	Ídem A y B
21 $\mu$ moles de $\alpha$ -cetoglutarato	+ Hexoquinasa de levadura	+ 2,4-dinitrofenol
30 $\mu$ moles de fosfato	+ 35 $\mu$ moles de glucosa	
ADP, citocromo c y MgSO <sub>4</sub>		

Se graficaron las siguientes curvas con los resultados indicados. Explique las diferentes gráficas.



2)- Un laboratorio farmacéutico envía muestras de dos inhibidores (A y B) para caracterizarlos como posibles antibióticos. Utilizando una preparación de mitocondrias de hígado incubada con piruvato, O<sub>2</sub>, ADP y Pi se observó lo siguiente:

Agregando a la preparación Inhibidor A se bloquea el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Una vez producida la inhibición se agrega a la mezcla el Inhibidor B y se observó que se restablecía el transporte electrónico, pero no la fosforilación oxidativa.

- ¿Cómo clasificaría estos inhibidores teniendo en cuenta su modo de acción en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa?
- Nombre inhibidores conocidos que podrían actuar del mismo modo.

3) Cuatro transportadores: a, b, c y d, cuyas formas reducidas y oxidadas pueden ser distinguidas espectrofotométricamente, se requieren para la respiración en un sistema de transporte de electrones bacteriano. En presencia de sustrato y oxígeno, tres inhibidores diferentes bloquean la respiración, obteniéndose los patrones de los estados de oxidación que aparecen en la Tabla. ¿Cuál es el orden de los transportadores en la cadena desde los sustratos hasta el oxígeno? Considerar que los inhibidores son agregados de manera independiente.

Tabla: Efecto de los inhibidores sobre los niveles de oxidación de los transportadores en una vía hipotética de transporte de electrones (+ y - indican las formas totalmente oxidadas y reducidas, respectivamente).

Inhibidor	a	b	c	d
1	+	+	-	+
2	-	-	-	+
3	+	-	-	+

4)- El gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a 30°C y a pH 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B, C, E, F, G, H). Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de O<sub>2</sub>.

**B:** ADP + Pi u Oligomicina

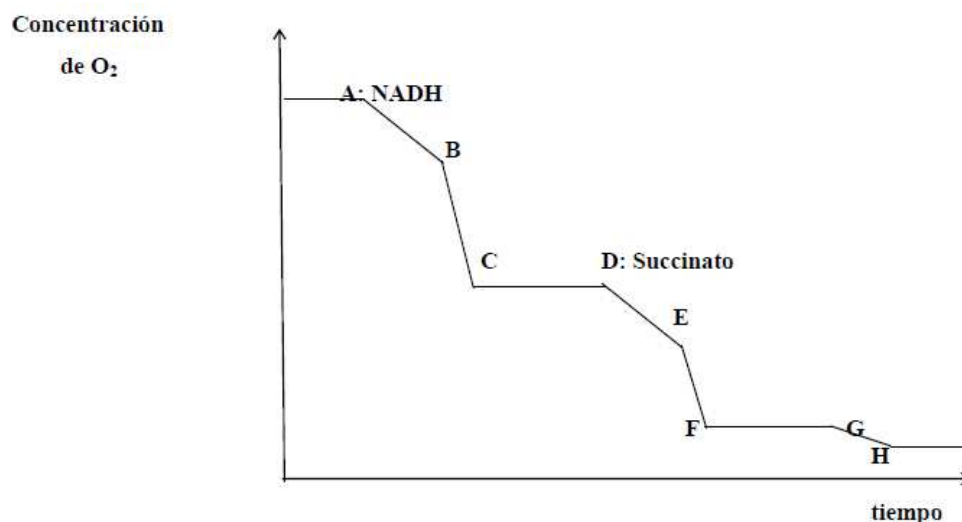
**C:** Rotenona o Antimicina

**H:** CN<sup>-</sup> o Amital

**F:** Malonato o Succinato

**G:** Malonato o Succinato

**E:** 2,4-DNF u Oligomicina



5) Considerando el translocador mitocondrial ADP-ATP y el simporter Pi-H. Explique cómo la actividad de estos dos transportadores afectan el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial.

## GUÍA DE ESTUDIO

### Transporte electrónico. Fosforilación oxidativa.

Localización de las enzimas. Deshidrogenasas piridina-dependientes y flavina-dependientes, ubiquinona, citocromos. Clases de enzimas y transportadores. Complejos.

. ¿Cómo están ubicados respecto al valor de su potencial de reducción? ¿A qué nivel de la cadena actúan los inhibidores? ¿En qué estado redox (oxidado o reducido) se encuentran los intermediarios cuando actúan los inhibidores?

### Centros de conservación de la energía para la fosforilación.

¿Dónde están ubicados los centros proveedores de energía para la fosforilación?

### Acción de inhibidores y desacoplantes:

¿Cómo actúan las sustancias desacoplantes, los inhibidores del transporte y los ionóforos? Ejemplos de cada uno de ellos.

. En presencia de un desacoplante ¿qué ocurriría respecto a: la concentración de Pi, la velocidad de oxidación, transporte de electrones, producción de calor, concentración de ADP mitocondrial, relación P/O?

. Cuando un sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee FAD como grupo prostético ¿Cómo es la relación P/O en ausencia de inhibidores, en presencia de cada uno de los inhibidores conocidos por separado o en presencia de desacoplantes?

¿Qué ocurriría si en el caso anterior el sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee NAD como coenzima?

### Fosforilación oxidativa. Hipótesis quimiosmótica.

### Bibliografía

BLANCO, A. "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, Bs. As, 2006. Reimpresión año 2007.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. y FERRIER D.R., "Bioquímica", Ed. Mac Graw- Hill Interamericana, 3° Edición. 2006.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, S.A., 4° Edición, 2006. Reimpresión año 2008.

STRYER, L., "Bioquímica", Ed. Reverté, 7° Edición, 2013.

FEDUCHI, E., BLASCO, I., ROMERO, C.S. y YÁÑEZ, E. "Bioquímica. Conceptos esenciales", Ed. Médica Panamericana, 2010.

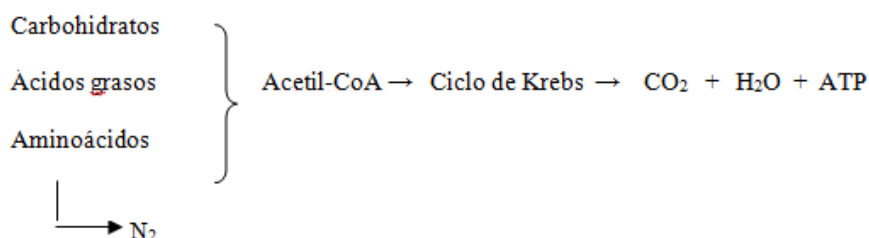
### TRABAJO PRÁCTICO N°3

#### METABOLISMO. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. PARTE I

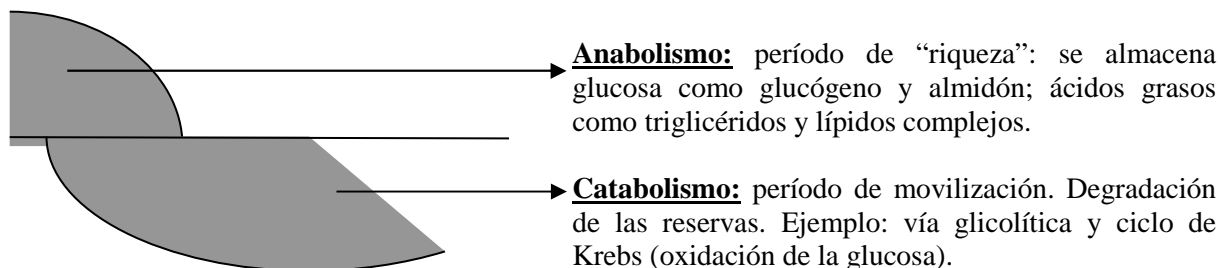
##### OBJETIVOS

- Comprender los procesos de catabolismo y anabolismo.
- Conocer las reacciones enzimáticas, los mecanismos de regulación y la función energética de la vía glicolítica.
- Comprender los procesos de fermentación.

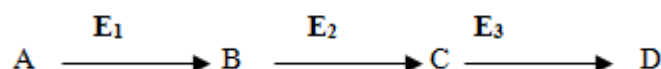
El **metabolismo** es el conjunto de todas las reacciones químicas que tienen lugar en las células y tejidos de los seres vivos. Se suele usar el término de Metabolismo Intermedio a las transformaciones que ocurren dentro de la célula. Las reacciones del proceso de digestión, previo a la absorción de sustancias en el tracto gastrointestinal, son consideradas reacciones pre-metabólicas. Se conoce como catabolismo a la fase de degradación en la cual las moléculas orgánicas nutrientes se convierten en productos más pequeños y sencillos. Durante el catabolismo se produce **energía libre**, parte de la cual se conserva como ATP. Es un proceso que tiene naturaleza oxidativa en donde el NAD es el principal agente de transferencia de equivalentes de reducción. En general son rutas convergentes, donde a partir de distintos nutrientes se genera un intermediario común que termina oxidándose por completo. Por ejemplo:



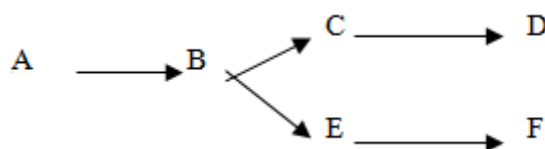
El anabolismo es la fase de biosíntesis, en donde precursores sencillos y pequeños se integran a moléculas más grandes: un ejemplo es la obtención de polisacáridos a partir de glucosa. Son procesos o transformaciones endergónicas que utilizan ATP y liberan ADP + Pi. Este hecho pone en evidencia el equilibrio dinámico que existe entre anabolismo y catabolismo. A lo largo del día oscilamos entre dos períodos:



Las rutas metabólicas a veces son **lineales**, en ellas el sustrato inicial por acción de distintas enzimas se convierte, en reacciones subsiguientes, en un producto final.



También existen rutas metabólicas **ramificadas**, donde a partir de un sustrato se pueden obtener dos o más productos finales:



Otra clase de ruta metabólica son las rutas cíclicas, donde uno de los componentes iniciales se regenera. Un ejemplo clásico de esta clase de rutas es el Ciclo de Krebs.

### Regulación metabólica

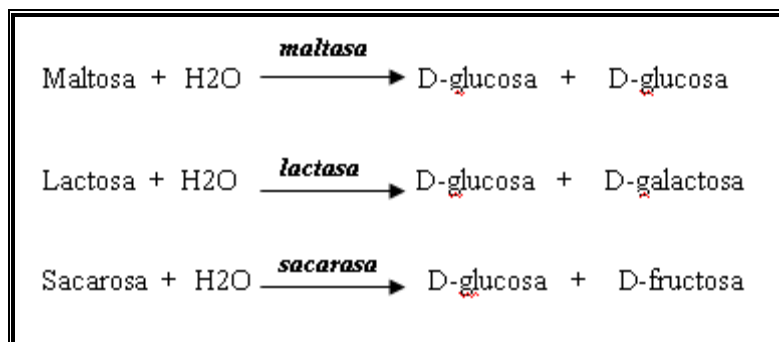
Las rutas metabólicas están reguladas a tres niveles:

- 1) La forma de regulación más inmediata es a través de las **enzimas alostéricas**, que pueden cambiar la actividad catalítica en respuesta a moduladores (estimuladores o inhibidores).
- 2) En organismos superiores, las **hormonas** coordinan las actividades metabólicas de diferentes tejidos.
- 3) Las células son capaces de regular la **cantidad** de distintas **enzimas**, modificando el equilibrio entre la velocidad de síntesis y degradación de la misma.

### METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Los hidratos de carbono susceptibles de ser degradados por los microorganismos, plantas y animales, son numerosos y variados. En los **microorganismos** el almidón y la celulosa no pueden penetrar en la célula y son escindidos por exoenzimas, enzimas hidrolíticas excretadas por los microorganismos al medio. En los **vertebrados**, los hidratos de carbono más frecuentemente ingeridos con la dieta son glucógeno, almidón, sacarosa, lactosa, glucosa y fructosa.

En los vertebrados, el proceso de digestión de los polisacáridos comienza en la boca por acción de amilasa salival o ptialina, una endoenzima, que actúa hidrolizando las uniones  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, separando restos de maltosa. Una vez que el bolo alimenticio llega al estómago, el pH ácido del mismo inactiva la enzima, por lo que su acción es muy breve. Por acción del jugo gástrico que segrega el estómago, el bolo alimenticio se transforma en quimo (líquido espeso y ácido), que al por el sistema digestivo, llega al duodeno. A través del conducto pancreático, la amilasa pancreática alcanza la luz del intestino y allí hidroliza las uniones  $\alpha$ -1,4-glicosídicas de los polisacáridos, que son digeridos completamente en presencia de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa. Los productos finales de la actividad de estas enzimas son maltosas, maltotriosas y dextrinas límites, las cuales son hidrolizadas hasta glucosa libre por acción de enzimas del borde en cepillo de la mucosa intestinal. Por ejemplo, la isomaltasa cataliza la hidrólisis de uniones  $\alpha$ -1,6 de la dextrina límite y  $\alpha$ -1,4-en maltosa. Sobre los disacáridos actúan disacaridasas: maltasa, sacarasa, lactasa.



Los únicos hidratos de carbono que pueden ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal son los monosacáridos. La glucosa y la galactosa comparten el mismo sistema de transporte en la membrana del borde en cepillo. Este sistema es llamado **SGLT1**, un transportador activo secundario dependiente de Na<sup>+</sup>. El sistema es impulsado por el gradiente de Na<sup>+</sup> creado por la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPasa situada en la membrana basolateral de los enterocitos.

## VÍA GLICOLÍTICA

La glucosa es el principal combustible de la mayor parte de los organismos. Este compuesto tiene la propiedad de ser muy rico en energía y puede ser movilizado rápidamente desde las reservas cuando el organismo sufre demandas de energía.

La vía glicolítica o glucólisis es la ruta principal del catabolismo de la glucosa, y se lleva a cabo no solamente en plantas y animales, sino también en muchos microorganismos. Como los organismos vivos surgieron inicialmente en una atmósfera que carecía de O<sub>2</sub> la degradación anaeróbica de la glucosa es el tipo de mecanismo biológico más antiguo para obtener energía. Algunas levaduras, microorganismos anaeróbicos, células que carecen mitocondrias (como los eritrocitos) y el músculo en contracción durante ejercicio intenso, dependen totalmente de esta vía para obtener energía.



Durante la vía glicolítica o Vía de Embden- Meyerhof una molécula de glucosa, que posee seis átomos de carbono, se degrada enzimáticamente a través de una secuencia de reacciones para dar dos moléculas de piruvato, que poseen tres átomos de carbono cada una. Durante esta secuencia de reacciones gran parte de la energía liberada se conserva en forma de ATP. La secuencia de reacciones se ha conservado y son similares en vertebrados, levaduras y vegetales, sólo difiere de una especie a otra en algún detalle de regulación y el destino posterior del piruvato.

La glucólisis se produce en el **citoplasma celular**. Las cinco primeras reacciones constituyen la **fase preparatoria**, donde se fosforila la glucosa y se incorporan a la vía las cadenas carbonadas de otros monosacáridos. En la **fase de generación de energía** se producen etapas de oxidorreducción y se conserva la energía en forma de ATP.

Todos los intermediarios están fosforilados y por consiguiente ionizados a pH 7 lo que les confiere carga negativa. Como las membranas celulares son generalmente impermeables a las moléculas que poseen una carga eléctrica, los intermediarios glicolíticos no pueden salir de la célula. La glucosa puede ingresar a la célula, y el lactato y el piruvato pueden salir de ella, solamente porque en la membrana celular existen sistemas de transporte específicos que permiten estos pasajes. Los grupos fosfatos son compuestos esenciales en la conservación de la energía metabólica, ya que en último término son transferidos al ADP para dar ATP, además estos grupos químicos sirven de unión para el acoplamiento adecuado de los intermediarios glicolíticos a los sitios activos de las enzimas correspondientes.

Una característica importante de casi todas las enzimas de la vía glicolítica es que requieren magnesio ( $Mg^{+2}$ ) para ejercer su actividad.

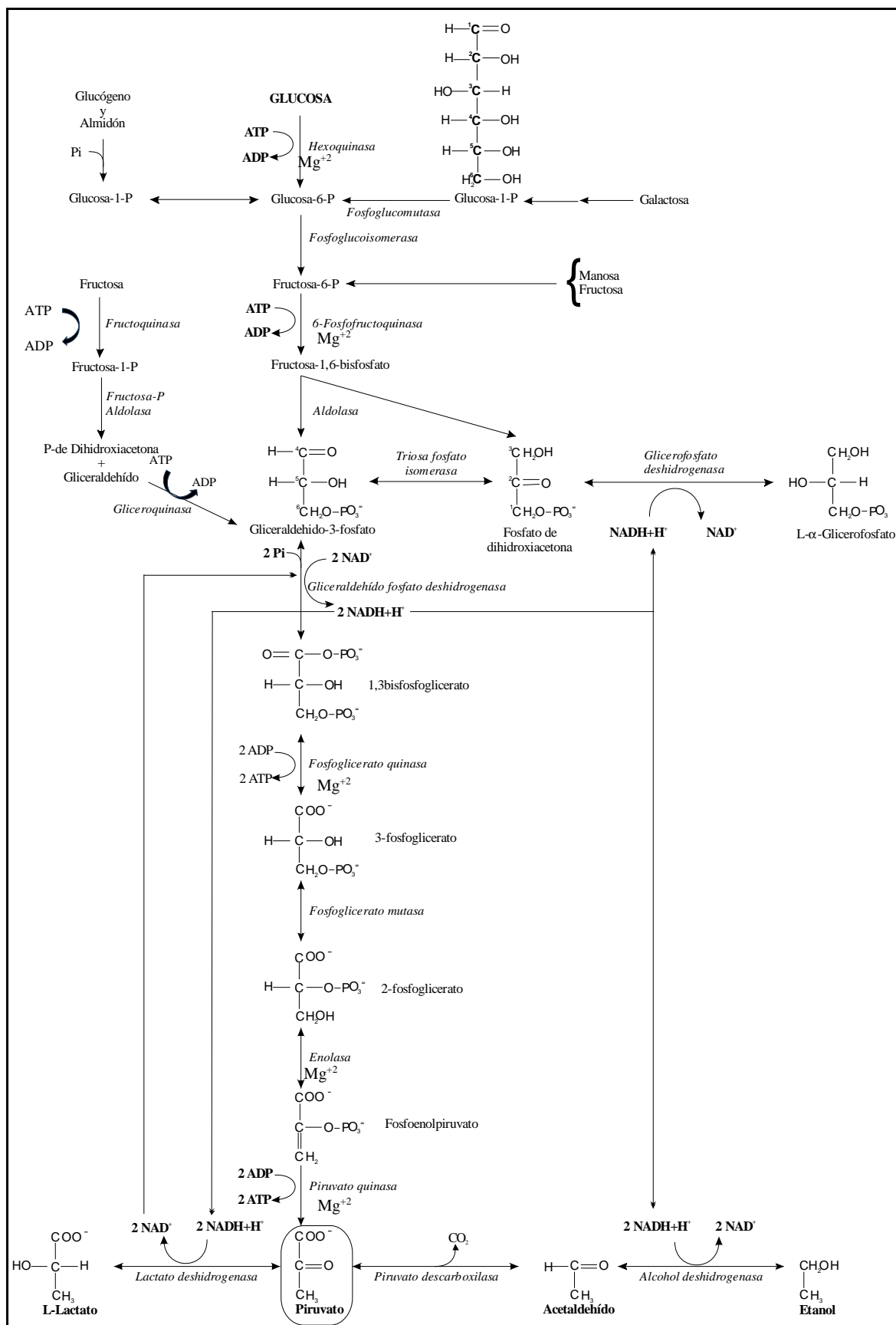
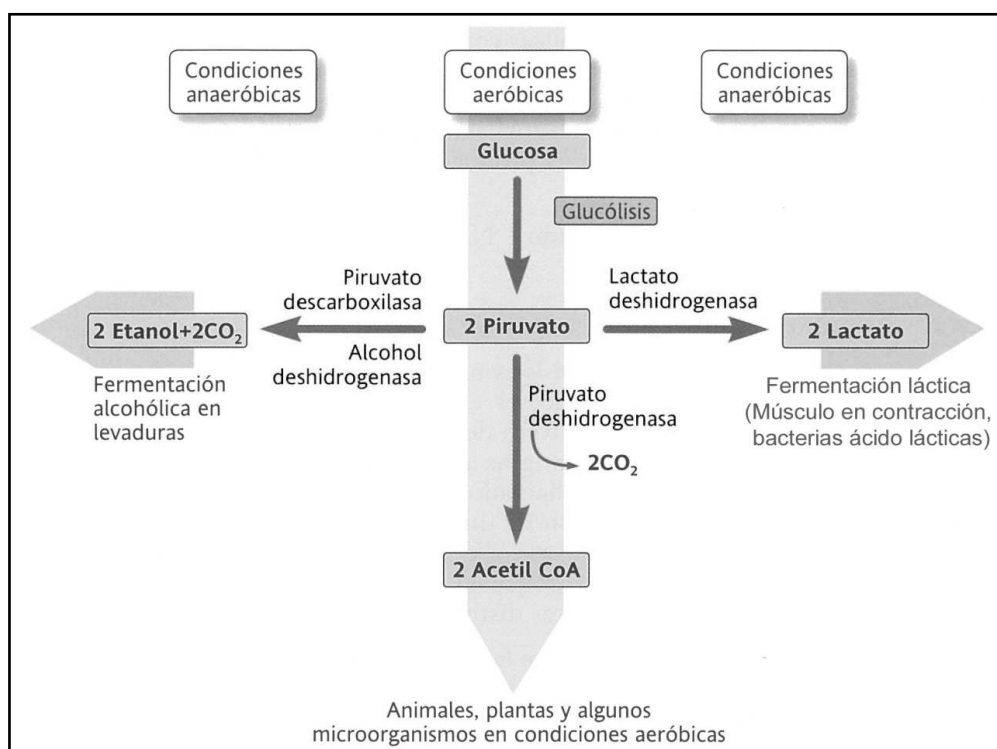


Figura 3.1. Esquema de la vía glicolítica y de los procesos de fermentación de piruvato en condiciones anaeróbicas.

Tres son las rutas importantes que puede seguir el piruvato después de la glucólisis:

En *aerobiosis* el piruvato producido en la glicólisis, ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí en una primera instancia a acetil-CoA, y finalmente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

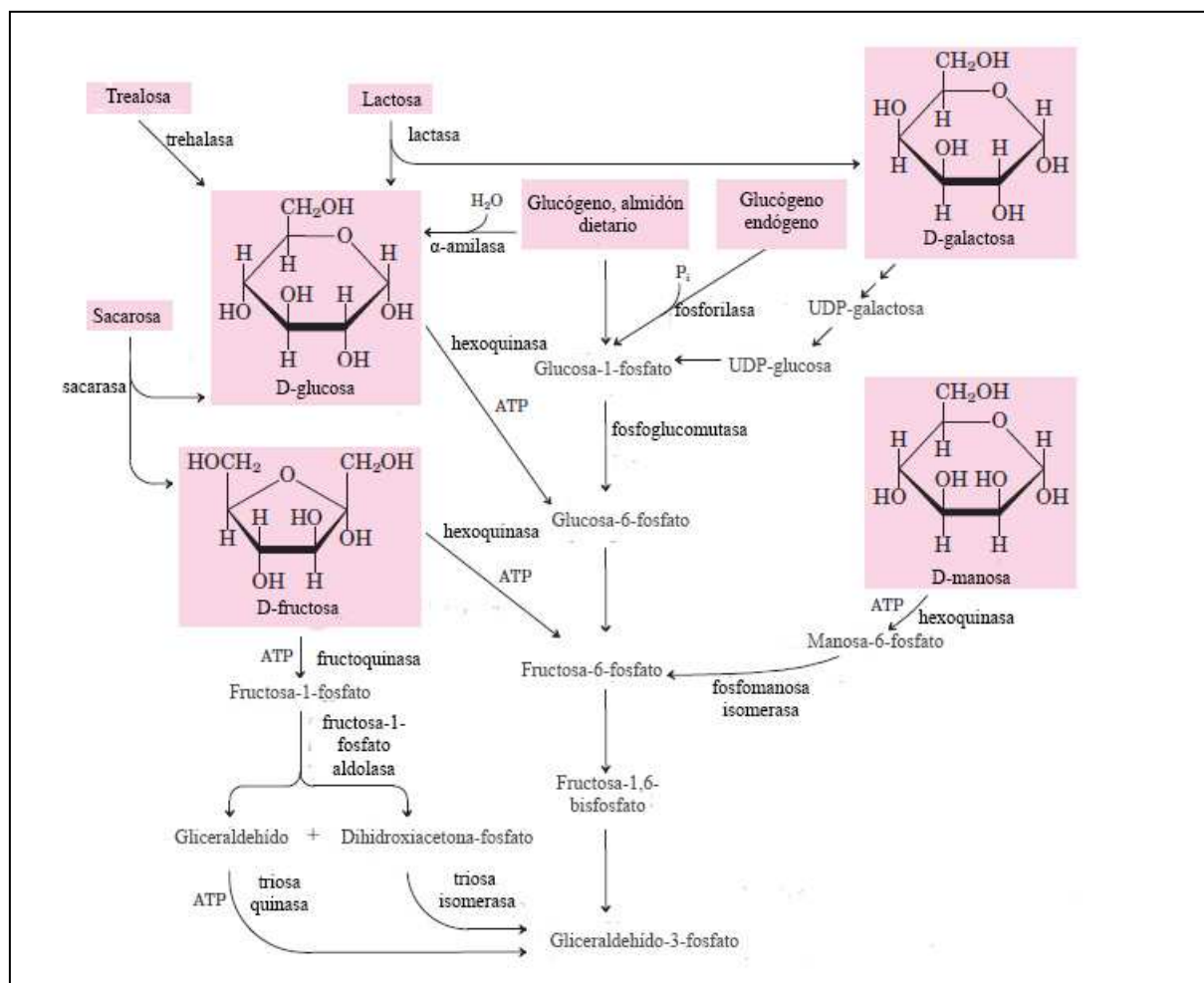
En *anaerobiosis* (ausencia de oxígeno) el piruvato puede ser reducido a lactato o etanol, de acuerdo al tipo celular, mediante procesos conocidos en general como *fermentaciones*.



**Fig. 3.2.** Destinos metabólicos del piruvato. Modificado desde Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 1° Edición.

### Rutas de "alimentación" que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, muchos carbohidratos se incorporan en último término a la secuencia glicolítica para experimentar degradación que rinde energía. Entre ellos podemos mencionar: fructosa, galactosa, trehalosa y manosa (monosacáridos). Para la incorporación de estos monosacáridos a la vía glicolítica, intervienen diferentes enzimas que en definitiva catalizan reacciones en las que se forman intermediarios de esta vía metabólica (ver figura 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema de la incorporación de distintos monosacáridos a la vía glicolítica. Modificado desde Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica". 5ª Edición.

### Puntos de regulación de la vía glicolítica

Como en todas las rutas metabólicas, la velocidad de la vía glicolítica está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas en las que están implicadas reacciones químicas irreversibles:

**1º Punto de Control:** a nivel de la hexoquinasa. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, la glucosa-6-fosfato, el cual inhibe su actividad.

**2º Punto de Control:** a nivel de la fosfofructoquinasa, la cual es una enzima alostérica, por lo tanto, su actividad es regulada por varios efectores. Su actividad es incrementada por ADP, AMP, fructosa 2,6-bisfosfato y es inhibida por ATP, NADH, citrato y ácidos grasos de cadena larga. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

**3º Punto de Control:** a nivel de la piruvato quinasa. Esta enzima es activada por fructosa-1,6-bisfosfato y es inhibida por ATP, ácidos grasos y acetil-CoA.

La regulación de la vía glicolítica explica el llamado "**efecto Pasteur**", el cual está basado en la regulación alostérica de las enzimas de la vía, ejercida por los niveles de ciertos metabolitos que

reflejan el equilibrio entre la producción y el consumo de ATP, adecuando de este modo la actividad glicolítica a las necesidades energéticas celulares.

### Balance energético de la oxidación de glucosa

Cuando la vía glicolítica tiene lugar en anaerobiosis, por cada molécula de glucosa metabolizada, se consumen 2 moles de ATP en la fase de preparación y se producen por fosforilación a nivel de sustrato 4 moles de ATP en la fase de beneficio. En consecuencia, el balance final es positivo, resultando en la formación neta de dos moles de ATP por cada mol de glucosa oxidada en la vía.

<i>Gasto de ATP (mol de glucosa)</i>		
Glucosa	→ Glucosa-6P	-1 mol de ATP
Fructosa-6P	→ Fructosa-1,6 bifosfato	-1 mol de ATP
<i>Producción de ATP (mol de glucosa)</i>		
1,3-Bifosfoglicerato	→ 3-fosfoglicerato	+ 2 mol de ATP
Fosfoenolpiruvato	→ Piruvato	+ 2 mol de ATP
<b>Balance total</b>		<b>2 mol de ATP</b>

**Tabla 3.1.** Tabla descriptiva del rendimiento energético de la vía glicolítica. Modificado desde Blanco, "Química Biológica", 8° Edición.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) A varios medios de cultivo inoculados con levaduras se agregó glucosa en igual concentración. A los 3 min. se determinó la glucosa por el método de la glucosa oxidasa y los resultados fueron aproximadamente de 0,8 g/l. Posteriormente se agregó a cada uno, en forma individual, las sustancias que se detallan en la columna A y a los 30 min se determinó glucosa obteniéndose los resultados indicados en la columna B.

Una con una flecha los datos de la columna B con la columna A según lo esperado para el consumo de azúcar en cada condición. La concentración de glucosa en el tubo testigo a los 30 min fue 0,20 g/l.

COLUMNA A	COLUMNA B (glucosa g/l)
1- Nada (testigo)	0,75
2- $\text{AsO}_4^{3-}$	0,20
3- NaF	0,20
4- $\text{AsO}_4^{3-} + \text{PO}_4^{3-}$	0,75
5- Citrato	0,75
6- Iodoacetato	0,10

2) En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con  $^{14}\text{C}$  en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) a pH= 5 y a 30° C. Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células (t=0) y luego de 1h de incubación se muestran en la siguiente tabla:

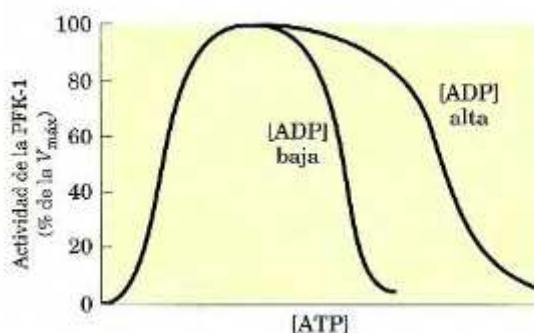
t (min)	% de radiactividad	
	tubo A	tubo B
0	100	100
60	98	65

- ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones, pero con 1-  $^{14}\text{C}$  glucosa.

3) En el gráfico siguiente se muestra el efecto del ATP sobre la enzima alostérica fosfofructoquinasa. A una concentración determinada de fructosa-6-fosfato, la actividad de la fosfofructoquinasa aumenta al aumentar las concentraciones de ATP, pero se alcanza un punto más allá del cual el incremento de ATP produce inhibición de la enzima.

- Explicar cómo el ATP puede ser sustrato e inhibidor de la fosfofructoquinasa. ¿De qué modo está regulada la glucólisis por los niveles de ATP?

b) Si suponemos que este gráfico corresponde a un ensayo *in vitro*, cuando se agrega ADP exógeno la inhibición de la fosfofructoquinasa por el ATP disminuye. ¿Cómo puede explicarse esta observación?



4) Existen varias alternativas para obtener combustibles mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la nafta es el etanolcarburante. El mercado potencial del etanol carburante es enorme y una ventaja adicional a su uso, la constituye el hecho de que es posible obtener etanol a partir de residuos agroindustriales, los cuales se encuentran en abundancia y constituyen una fuente importante de contaminación. Una de las cepas más estudiadas y utilizadas para la producción biotecnológica de etanol es la cepa de *Escherichia coli* KO11. En un intento por mejorar el rendimiento de producción de etanol mediante ingeniería genética se modificó el nivel de expresión de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, obteniéndose los siguientes resultados:

Modificación genética	Consumo de glucosa	Producción de etanol
Aumento en la expresión y AE de piruvato quinasa	Disminución del 68%	Disminución del 60%
Aumento en la expresión y AE de piruvato quinasa y piruvato descarboxilasa	Aumento del 20%	Aumento del 45%

a) ¿Cómo explica estos resultados?

b) Si usted fuera el investigador del ejemplo, ¿la modificación de qué actividades enzimáticas investigaría? ¿por qué?

## GUÍA DE ESTUDIO

### Vía glicolítica:

- Esquema con fórmulas de las reacciones, enzimas y cofactores.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?
- Acción de la hexoquinasa y de la glucoquinasa: sustrato sobre el cual actúan, producto de la reacción que catalizan. Diferencia en los valores de  $K_m$ .
- Función de los grupos fosfato en los intermediarios.
- ¿Cuáles son los monosacáridos más comunes que pueden ingresar a la vía glicolítica?
- Balance energético: producción neta de ATP por degradación de glucosa a piruvato.

### Regulación:

- Puntos de regulación de la vía glicolítica: enzimas implicadas.
- ¿Qué compuestos activan o inhiben las enzimas que intervienen en la regulación?
- Efecto Pasteur como mecanismo de adaptación celular.

### Destino del piruvato

- Fermentación alcohólica y láctica: productos, enzimas y cofactores. Rendimiento energético. Formulación de las reacciones implicadas.

### Bibliografía

- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, 2006. Reimpresión año 2007
- FEDUCHI, E, BLASCO I, ROMERO, C , YÁÑEZ, E. Bioquímica. Conceptos esenciales, Editorial Panamericana, 1° Edición, 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Editorial Omega, S.A., 5° Edición, 2008.



---

**TRABAJO PRÁCTICO N° 4**  
**HIDRATOS DE CARBONO (PARTE II):**  
**VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO.**  
**CICLO DE KREBS.**

**OBJETIVOS**

- Conocer el metabolismo del glucógeno y su regulación.
- Comprender y conocer el ciclo de Krebs: enzimas implicadas, puntos de regulación, balance energético.
- Conocer la secuencia de reacciones de la vía de las pentosas fosfato, destino de los productos (NADPH, ribosa-5-fosfato), interrelaciones con la vía glicolítica, su regulación y su importancia en los alimentos.

**INTRODUCCION TEÓRICA**

De todos los polisacáridos existentes en la naturaleza, el hombre es capaz de digerir almidón y glucógeno. El glucógeno es similar a la amilopectina del almidón, aunque está más ramificado, y constituye la reserva energética de los organismos animales.

El ciclo de Krebs o ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Estas secuencias de reacciones enzimáticas tienen lugar únicamente en los organismos aerobios. Este ciclo metabólico se encuentra catalizado por un sistema multienzimático, que acepta como combustible al grupo acetilo de la acetil-CoA, degradándolo hasta  $\text{CO}_2$  y pares de  $\text{H}^+$  y  $\text{e}^-$ . Estos últimos son conducidos a través de una cadena de transportadores hasta el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), que actúa como aceptor final en la cadena de transporte electrónico de las células de la mayoría de los organismos, y se reduce para formar  $\text{H}_2\text{O}$ .

**METABOLISMO DE GLUCÓGENO**

En el hígado el glucógeno actúa como depósito de glucosa, y durante su degradación secuencial, se libera glucosa que alcanza la circulación general para su distribución a otros tejidos.

Por otra parte, en el músculo el glucógeno se degrada para proporcionar energía en forma de ATP para permitir la contracción muscular.

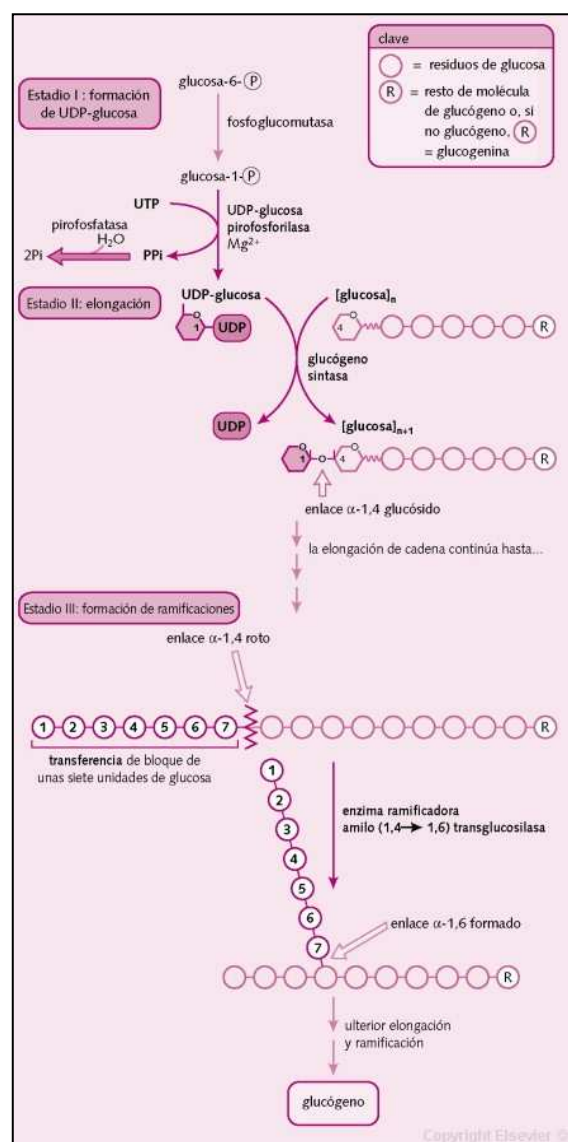
El metabolismo de glucógeno abarca básicamente, su síntesis (“glucogenogénesis”) y su degradación (“glucogenólisis”).

### a) Glucogenogénesis (síntesis de glucógeno)

La formación de glucógeno a partir de glucosa se realiza en muchos tejidos, principalmente hígado y músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía aportada por el ATP y UTP (uridina trifosfato), y es regulado a través de la enzima glucógeno sintetasa.

La síntesis de glucógeno abarca 5 etapas (ver figura 4.1):

- 1- Fosforilación de glucosa en el carbono 6 por acción de **hexoquinasas**.
- 2- Formación de glucosa-1-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato, catalizada por la enzima fosfoglucomutasa.
- 3- Activación de glucosa-1-fosfato a UDP-glucosa (uridina-disfosfato-glucosa), reacción catalizada por la enzima uridina-difosfato-glucosa pirofosforilasa o glucosa-1-P-uridiltransferasa.
- 4- Incorporación de glucosa activada a una molécula de glucógeno preexistente, o a la glucogenina (proteína) a través de una unión  $\alpha \rightarrow 1-4$ , reacción catalizada por la glucógeno sintasa.
- 5- Formación de ramificaciones mediante uniones glicosídica  $\alpha \rightarrow 1,6$ , catalizada por la enzima ramificante.



**Fig. 4.1.** Etapas de la síntesis de glucógeno. Lim, Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 3ª Edición.

### b) Degradación del glucógeno (glucogenólisis)

La glucogenólisis o el catabolismo del glucógeno no es un proceso inverso a la síntesis de glucógeno, dado que utiliza enzimas diferentes a la vía anabólica.

Las etapas involucradas son las siguientes (ver figura 4.2):

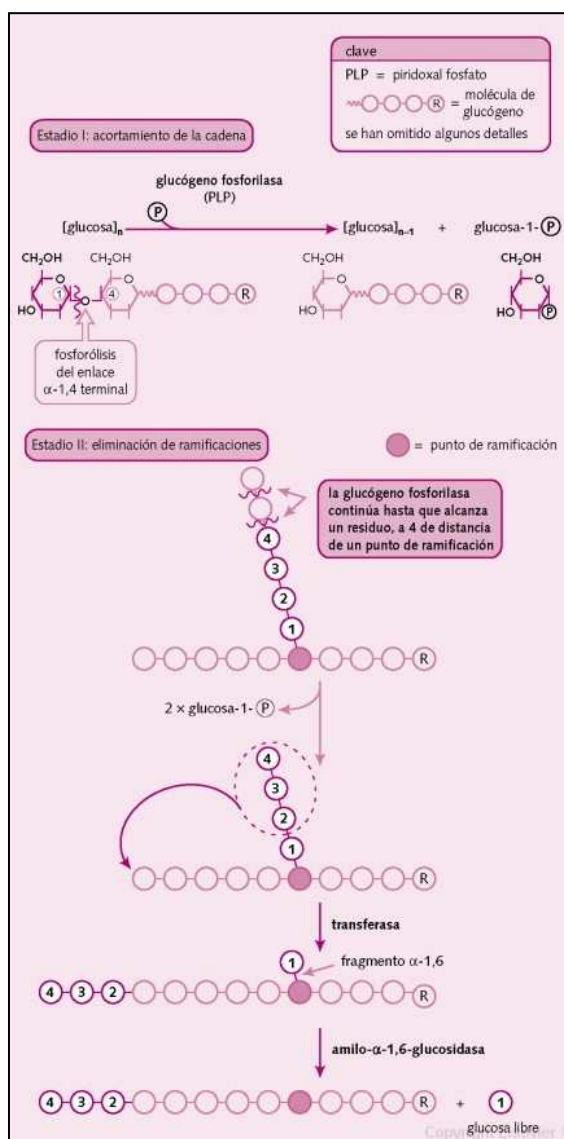
**1-** Liberación de unidades de glucosa-1-fosfato a partir del extremo no reductor, reacción catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa. El fosfato utilizado proviene del fosfato inorgánico del medio. Esta etapa no requiere de energía metabólica o gasto de ATP. La acción de la enzima se detiene 4 unidades de glucosa antes de una ramificación  $\alpha \rightarrow 1,6$  glicosídica.

**2-** Transferencia de unidades del trisacárido terminal al extremo de la rama vecina por unión  $\alpha \rightarrow 1,4$ . Esta reacción es catalizada por una *transferasa*. Reiniciando la etapa 1.

**3-** Hidrólisis de las uniones  $\alpha 1,6$  glicosídicas. Esta reacción es catalizada por la enzima  $\alpha$ -1,6 glicosidasa con liberación de unidades de glucosa sin fosforilar.

Las enzimas que actúan en las etapas 2 y 3 forman parte de una proteína bifuncional denominada enzima desramificante.

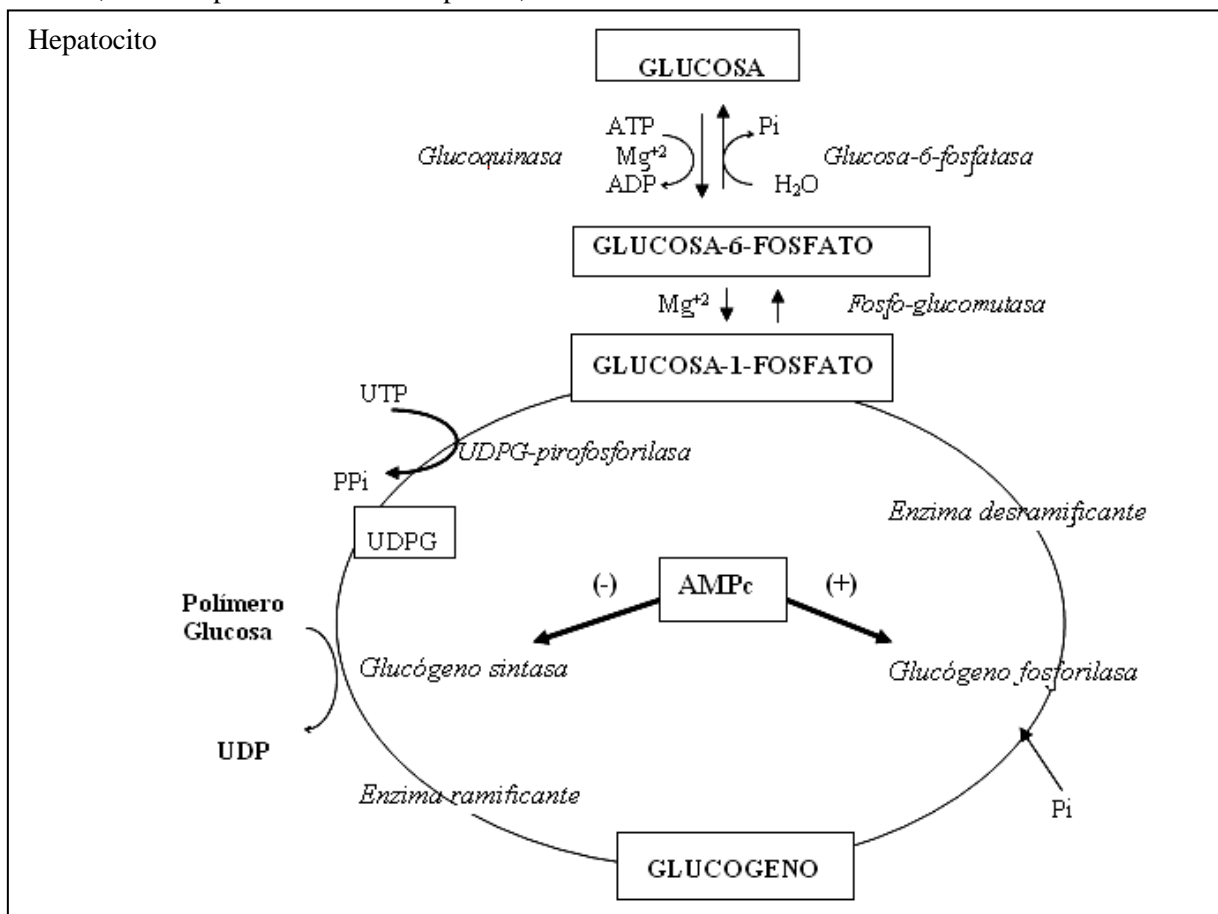
**4-** Formación de glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa-1-fosfato liberada en la etapa 1. Esta reacción de isomerización es catalizada por la enzima *fosfoglucomutasa*.



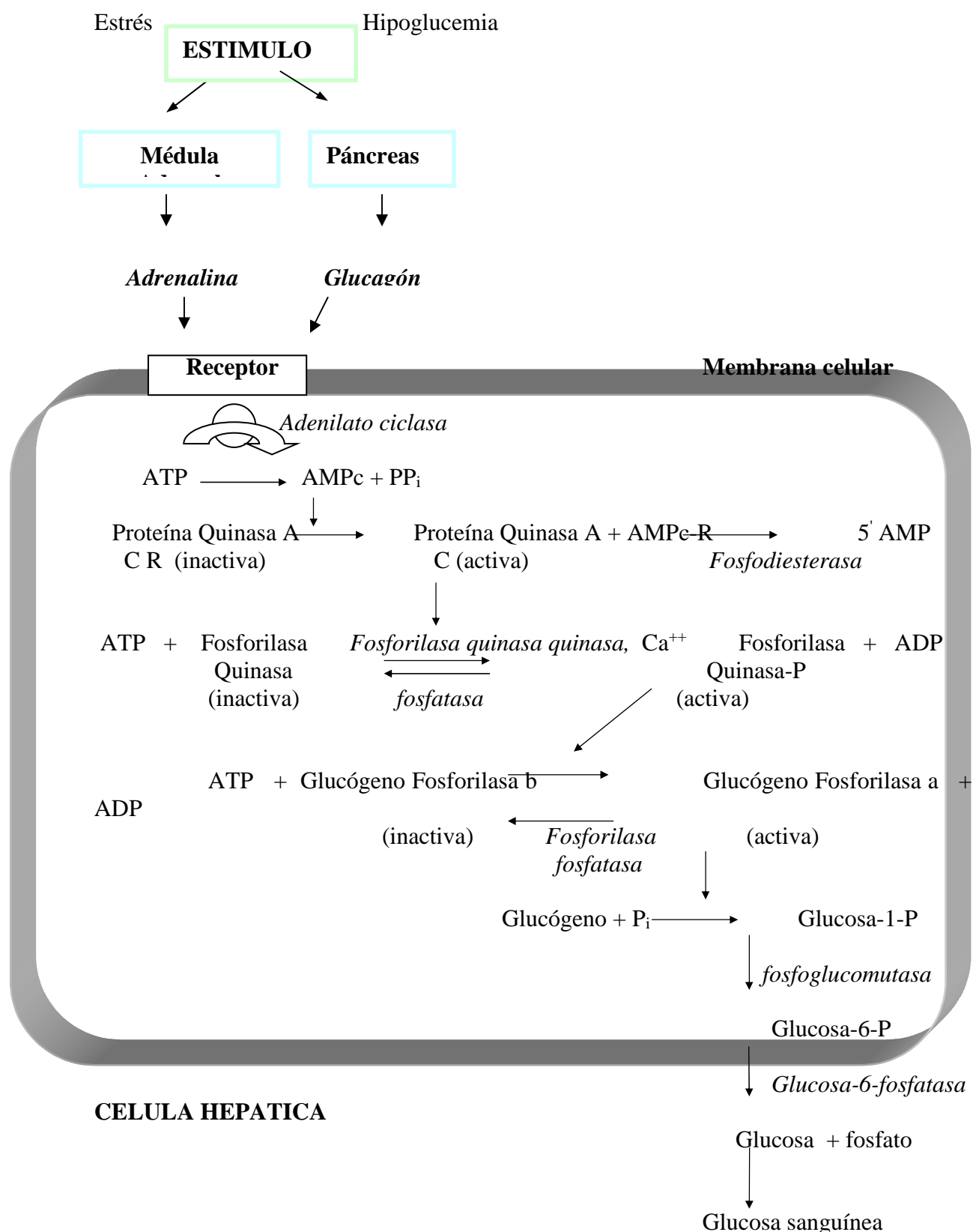
**Fig. 4.2.** Etapas de la degradación de glucógeno. Lim, Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 3ª Edición.

### Regulación del metabolismo de glucógeno

El metabolismo de glucógeno es regulado a través de las enzimas glucógeno sintetasa y glucógeno fosforilasa. A su vez, ambas enzimas son moduladas por modificación covalente por agregado o sustracción de grupos fosfatos de manera recíproca, es decir cuando se activa una enzima, la correspondiente a la vía opuesta, se inhibe.



**Fig.4.3.** Esquema de regulación recíproca de glucogenólisis y glucogenogénesis.

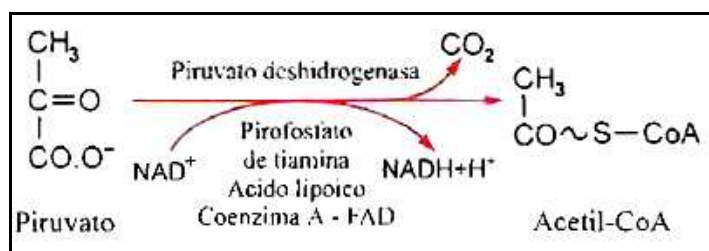


**C R:** Centro catalítico regulador  
**C:** subunidad catalítica  
**R:** subunidad reguladora

**Fig.4.4.** Esquema de las cascadas de señalización intracelulares en músculo o hígado, desencadenadas luego de la estimulación con noradrenalina o glucagón, respectivamente.

### Descarboxilación oxidativa del piruvato

El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será metabolizado a acetil-CoA por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa. Este complejo está constituido por tres enzimas: piruvato descarboxilasa o E<sub>1</sub>, dihidrolipoil transacetilasa o E<sub>2</sub>, y dihidrolipoil deshidrogenasa o E<sub>3</sub>, y requiere de cinco coenzimas: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD.



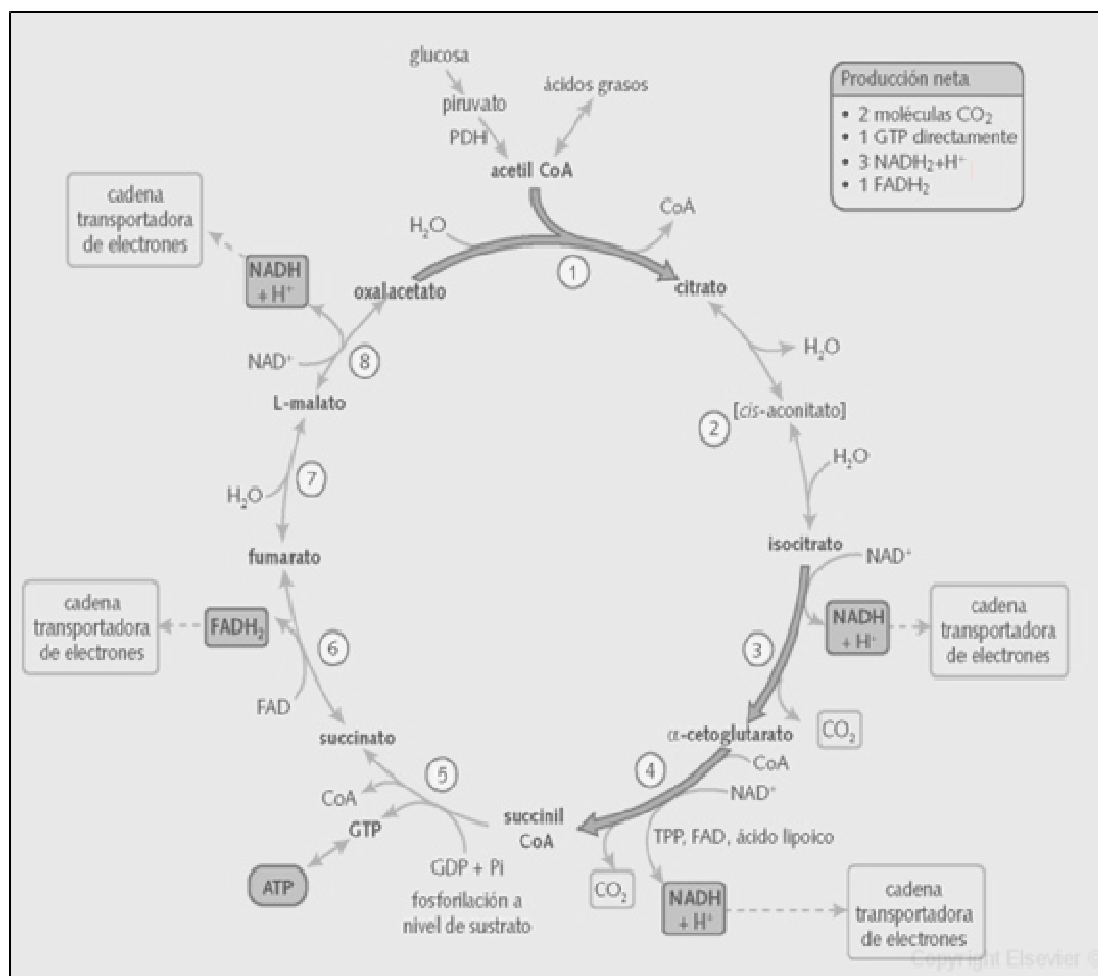
**Fig. 4.5.** Reacción de descarboxilación del piruvato.

El NADH producido en esta reacción transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se unen a oxígeno para formar agua, en el proceso se obtienen 3 ATP desde ADP.

### Reacciones del ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de acetil-CoA, derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Estas secuencias de reacciones enzimáticas ocurren en la matriz mitocondrial de organismos aeróbicos, en donde todas las enzimas se encuentran libres, excepto la succinato deshidrogenasa que está unida a la cara interna de la membrana mitocondrial interna.

El ciclo se considera un sistema cerrado donde, a través de una secuencia de ocho reacciones (ver figura 4.5), el acetil-CoA se degrada hasta  $\text{CO}_2$ , formándose coenzimas reducidas cuyos equivalentes de reducción ingresan a la cadena respiratoria a nivel de los complejos I y II, con la consecuente síntesis de ATP y  $\text{H}_2\text{O}$ .

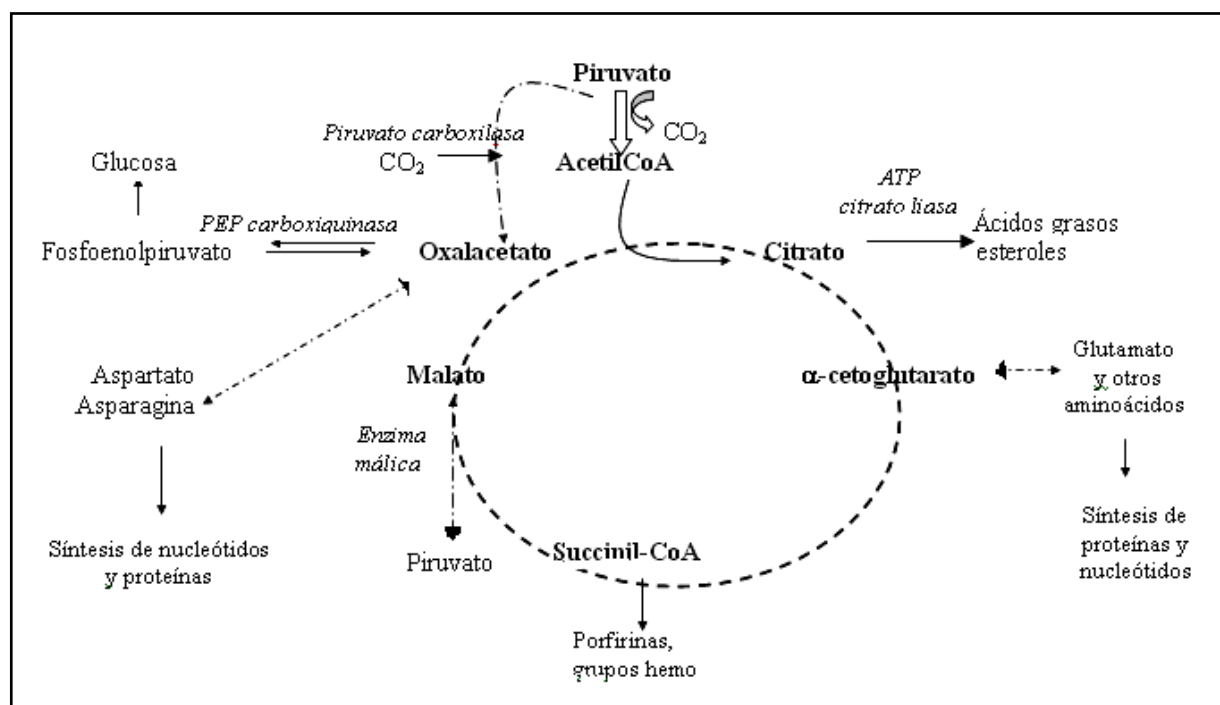


**Fig. 4.5.** Esquema de las reacciones involucradas en el ciclo de Krebs. Lim, Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”. 3 ed. 1- Citrato Sintasa. 2- Aconitasa. 3- Isocitrato deshidrogenasa. 4- Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa. 5- Succinato tioquinasa. 6- Succinato deshidrogenasa. 7- Fumarasa. 8- Malato deshidrogenasa.

### **Función anaplerótica del ciclo de Krebs**

Si bien el ciclo de Krebs es una vía catabólica donde se oxida acetil- CoA hasta  $\text{CO}_2$ , varios de los intermediarios están relacionados con otras vías metabólicas pudiendo ser utilizados en la síntesis de otros compuestos, en este caso el ciclo de Krebs aporta precursores para distintos procesos anabólicos. Esta participación del ciclo en ambos procesos, catabólicos y anabólicos, permiten considerarlo como una vía anfibólica.

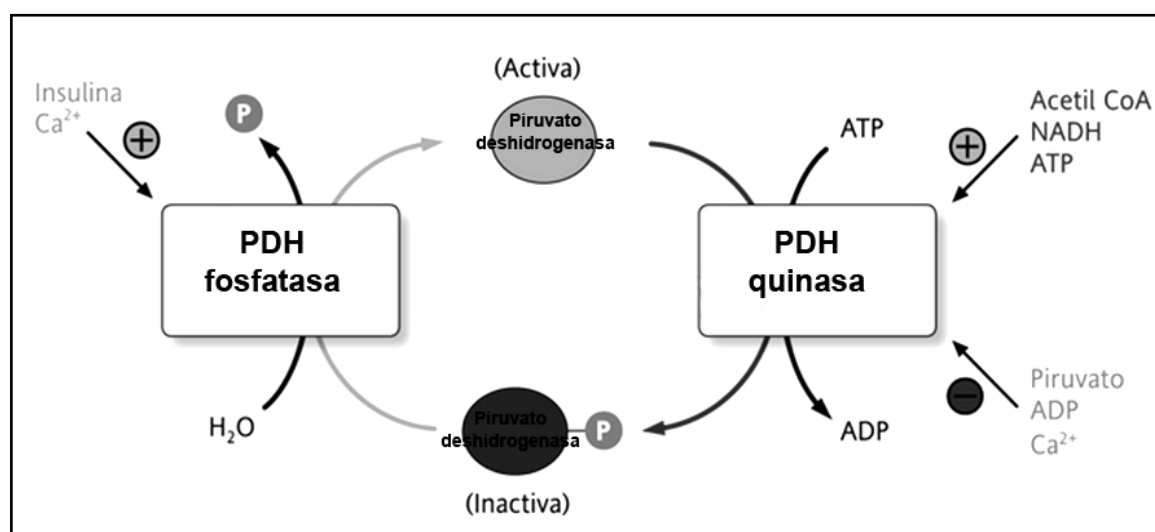
A medida que los intermediarios del ciclo de Krebs son retirados para servir como precursores biosintéticos, son repuestos mediante reacciones anapleróticas. En circunstancias de homeostasis, las reacciones por las que los intermediarios del ciclo se dirigen hacia otras vías y aquellas que permiten reponerlos se encuentran en equilibrio dinámico. De esta manera, las concentraciones de los intermediarios del ciclo permanecen prácticamente constantes.



**Figura 4.6.** Funciones anapleróticas del ciclo de Krebs. Los intermediarios del ciclo de Krebs salen del mismo para actuar como precursores de muchas rutas biosintéticas, dando lugar a productos que se indican con flechas de líneas continuas ( —→ ). Indicadas con flechas de líneas cortadas ( ---→ ), se muestran cuatro reacciones anapleróticas que permiten reponer intermediarios consumidos en el ciclo.

### Regulación del ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs está modulado **indirectamente** por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, el cual está regulado mediante fosforilación reversible (ver figura 4.7). Además, este complejo enzimático es inhibido por ATP, acetil-CoA y NADH, mientras que es estimulado por insulina y el  $\text{Ca}^{++}$  (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula a una fosfatasa que actúa sobre la piruvato deshidrogenasa).



**Fig.4.7.** Esquema de la regulación por modificación covalente del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Feduchi, Blasco, Romero y Yáñez, “Bioquímica. Conceptos esenciales”, 1º Edición

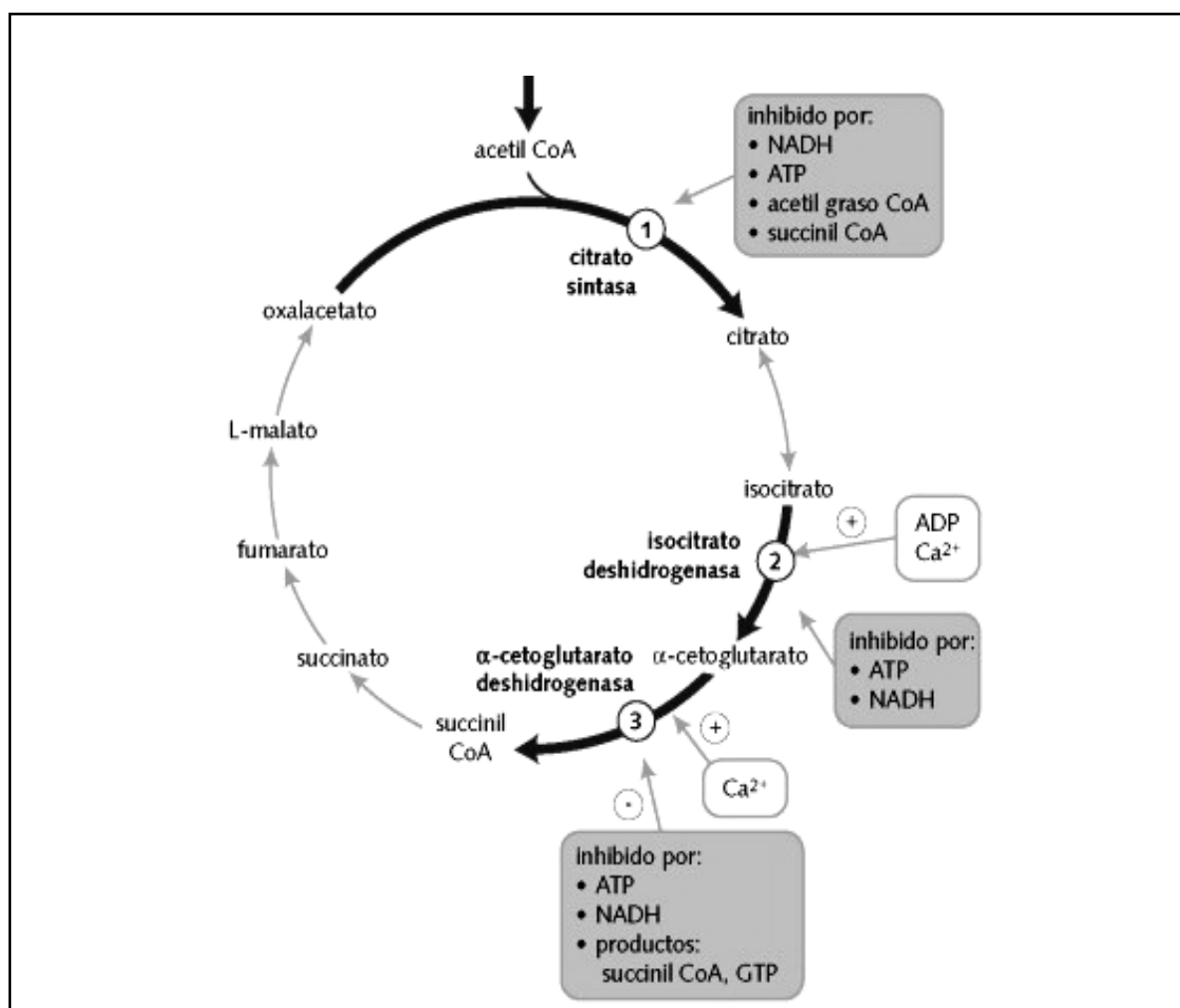


La regulación directa del ciclo de Krebs propiamente dicho, se lleva a cabo en tres puntos principales:

**1º Punto de Control:** se encuentra en la reacción catalizada por la enzima citrato sintasa, la cual es una enzima alostérica modulada negativamente por el ATP (aumenta el  $K_m$  de la enzima) y por los ácidos grasos de cadena larga.

**2º Punto de Control:** se produce a nivel de la isocitrato deshidrogenasa. Esta enzima tiene como modulador alostérico positivo el ADP, mientras que NADH y ATP actúan como moduladores negativos.

**3º Punto de Control:** ocurre a nivel de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, enzima regulada de forma análoga al complejo piruvato deshidrogenasa.



**Fig. 4.8.** Regulación directa del ciclo de Krebs, a través de la modulación de las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. Lim, Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición". 3 ed.

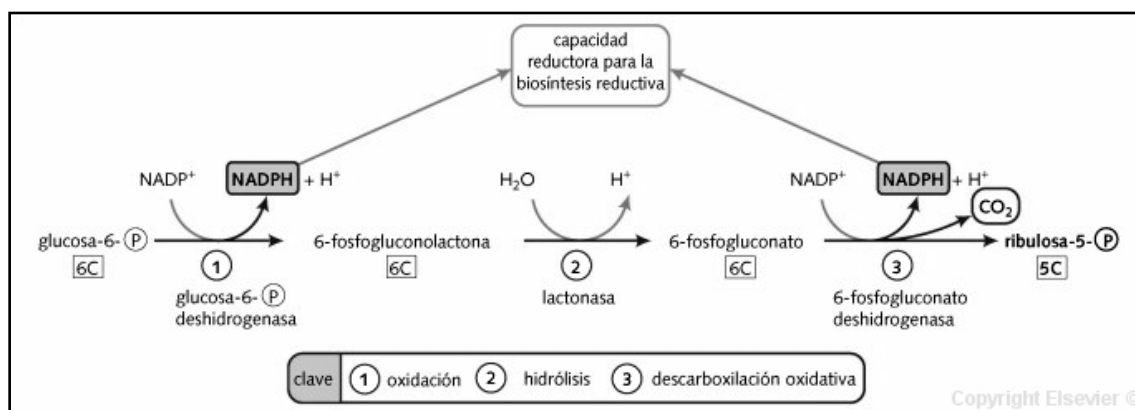
## VIA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

La glucosa-6-fosfato puede ser catabolizada por la “vía de las pentosas-fosfato”, una ruta alternativa para el metabolismo de la glucosa, que ocurre en el citoplasma. Los objetivos fundamentales de esta vía son: formación de NADPH y síntesis de ribosa-5-fosfato. El NADPH es el principal agente reductor de la célula, utilizado principalmente en procesos de biosíntesis (síntesis de ácidos grasos, colesterol, esteroides, etc.) y detoxificación celular. La ribosa-5-fosfato es necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Esta vía posibilita la interconversión de varios carbohidratos de 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono, algunos de los cuales son también intermediarios de la vía glicolítica. (gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato). Para comprender las reacciones que tienen lugar en esta vía se consideran dos fases: Fase oxidativa (reacciones irreversibles) y Fase no oxidativa (reacciones reversibles).

### • Fase Oxidativa:

Esta fase consta de tres reacciones irreversibles, dando como resultado la formación de ribulosa-5-P,  $\text{CO}_2$ , y dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa-6-P que se oxida.

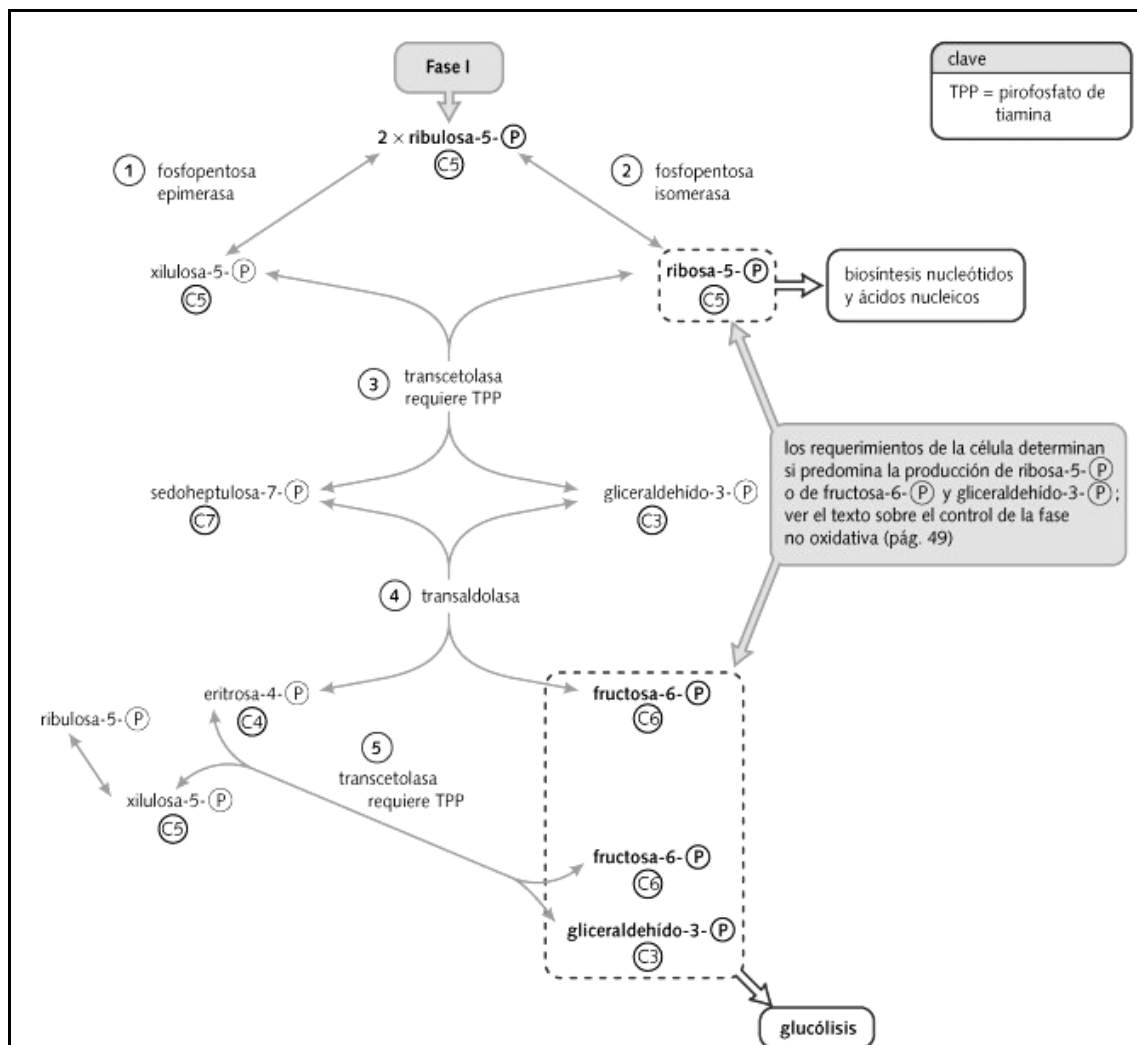


**Fig. 4.9.** Fase oxidativa de la vía de las Pentosas fosfato. Lim, Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”, 3ª Edición.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa son dos enzimas que actúan como oxido-reductasas, utilizando como coenzima el NADP oxidado. Esta coenzima es un derivado de la niacina o vitamina B3. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la enzima reguladora de la vía de las pentosas fosfato, siendo inhibida por uno de sus productos: el NADPH. La deficiencia de esta enzima provoca una pérdida o descenso de NADPH que cumple funciones como antioxidante. El descenso de NADPH permite la oxidación de lípidos de la membrana plasmática, lo cual es especialmente grave en los eritrocitos. En esta situación, los mismos sufren fragilidad de la membrana plasmática, favoreciendo su ruptura, lo que causa a su vez anemia hemolítica.

### • Fase no oxidativa

Esta etapa consta de una serie de cinco reacciones reversibles donde ocurren interconversiones desde ribulosa-5-P a ribosa-5-P para la síntesis de nucleótidos, o a intermediarios de la glucólisis tales como gliceraldehído-3-P o fructosa-6-P.



**Fig. 4.10.** Fase no oxidativa de la Vía de las Pentosas-Fosfato. Lim, Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 3ª Edición.

En esta fase se producen una heptosa (7 C, pseudoheptulosa-7-P), una hexosa (fructosa-6-P), dos pentosas (ribosa-5-P y xilulosa-5-P), una tetrosa (eritrosa-4-P) y una triosa (gliceraldehído-3-P).

Intervienen dos enzimas que transportan unidades de tres o dos carbonos, la transaldolasa y transcetolasa, respectivamente. Esta última enzima requiere como cofactor pirofosfato de tiamina (PPT), derivado de la vitamina B1 o tiamina.

---

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1- A continuación, se da una lista de enzimas que están ausentes en el catabolismo de hidratos de carbono y una segunda lista de posibles consecuencias de tales efectos. **Justificar las respuestas.**

**Enzimas ausentes**

- a) Fosfofructoquinasa
- b) Fosfoglucomutasa
- c) Triosafofatoisomerasa
- d) UDP-Gal-4- epimerasa
- e) Glucógeno fosforilasa quinasa
- f) Glucógeno fosforilasa fosfatasa

**Consecuencias**

- 1) Incapacidad para utilizar galactosa como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar glucógeno.
- 2) Incapacidad para utilizar el glucógeno o galactosa como fuente de energía.
- 3) Capacidad disminuida para obtener energía de los carbohidratos.
- 4) Evita el uso de la mayor parte de los carbohidratos para la producción de ATP.
- 5) Una disminución en el nivel normal del estado estacionario del glucógeno.
- 6) Incapacidad para utilizar glucógeno como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar galactosa.

Ubique cada enzima con la consecuencia más probable (solamente una) de la segunda lista.

2-Señálese la posición del carbono isotópico en el ácido cítrico, cuando se incuban los siguientes compuestos marcados isotópicamente:

- a) 3-<sup>\*</sup>C –Piruvato      b) 2-<sup>\*</sup>C- Piruvato      c) 5-<sup>\*</sup>C- Fructosa-6-fosfato

3- ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> por un homogenato celular? Supóngase que la vía glicolítica, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa son completamente activos.

- a) Piruvato      b) Lactato      c) Fructosa-1,6-bisfosfato

**4-** Se desea realizar un experimento para determinar el funcionamiento de la vía de las pentosas, fosfato utilizando glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$  ¿en qué posición colocaría la marca para que aparezca solamente en un producto exclusivo de la vía de las pentosas y no de la vía glicolítica? Considerar que no funciona el ciclo de Krebs.

**5-** Se incubó glucosa-6-fosfato marcada con  $^{14}\text{C}$  en  $\text{C}_6$  con una suspensión de eritrocitos en presencia de un potente inhibidor de la fosfoglucoisomerasa. Al cabo de un tiempo se detectó la presencia de piruvato  $^{14}\text{C}$ .

Esquematice las reacciones que llevan a la producción del mismo señalizando el carbono marcado.

**6-** Se aislaron eritrocitos de la sangre de un individuo normal y de un paciente con deficiencia de tiamina. Las células fueron incubadas con buffer conteniendo  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa y se determinaron las cantidades de  $^{14}\text{CO}_2$  y  $^{14}\text{C}$ -láctico formados al cabo de 1 hora. Analice los resultados obtenidos que se indican en la tabla y justifique la disminución de  $\text{CO}_2$  para el individuo deficiente.

Productos	% de $^{14}\text{C}$ en productos	
	Individuo Normal	Individuo Deficiente
$\text{CO}_2$	10,4	1,7
Láctico	80,0	98,0

## 7- Integración de las vías metabólicas en mamíferos

En base a los siguientes criterios clave complete el cuadro con las vías indicadas, así logrará tener una visión en conjunto de cada una de ellas.

	GLICÓLISIS	GLUCOGENOLISIS	GLUCOGENOGENESIS	CICLO DE KREBS	VIA DE LAS PENTOSASS
<b>Criterios claves</b> Cuál es la función de la vía. Indique el sustrato, el producto y otros compuestos de interés.					
<b>Localización</b> En particular tejidos o células del organismo					
<b>Compartimentalización</b> Lugar del proceso en el interior de la célula.					
Etapas globales de la vía y principales puntos de control.					
Mencione la relación con otras vías metabólicas.					

---

## GUÍA DE ESTUDIO

### Glucogenólisis:

- Degradación de glucógeno en el hepatocito: ¿en qué tipo de unión y sobre qué extremo actúa la primera enzima que interviene en la degradación? ¿Cuáles son los productos de dicha reacción?
- ¿Cuáles son las enzimas que actúan sobre el glucógeno para degradarlo a Glucosa-6-fosfato y dextrina límite?

### Ciclo de Krebs:

- ¿En qué lugar de la célula se llevan a cabo las reacciones del ciclo de Krebs?
- Formular todas las reacciones del ciclo, nombrando las enzimas y coenzimas.
- En cada una de las reacciones de tipo redox que ocurren en este ciclo metabólico, ¿qué compuesto se oxida y cuál se reduce?
- ¿Cuántos moles de ATP se producen por degradación de: acetil-CoA y piruvato?
- ¿Cuál es el aceptor de electrones en cada reacción de oxidación que ocurre en el ciclo?
- ¿Cuáles son las enzimas que intervienen en la regulación directa del ciclo de Krebs y cuáles regulan esta vía de manera indirecta?
- ¿Qué intermediarios del ciclo pueden servir como precursores de otras vías metabólicas?

### Vía de las pentosas fosfato

- Reacciones, enzimas y cofactores. Formular.
- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la transaldolasa y transcetolasa? ¿En qué reacciones actúan estas enzimas? ¿Cuáles son las enzimas de la fase oxidativa? ¿En cuáles reacciones se produce NADPH? ¿Qué vías metabólicas pueden utilizar este producto?
- ¿Qué reacciones catalizan las enzimas epimerasa e isomerasa? ¿Cómo actúa el pirofosfato de tiamina?
- En la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato ¿Cuáles son los productos de reacción?
- ¿Qué intermediarios de la vía glicolítica se producen en esta vía? ¿En qué órganos y tejidos es principalmente activa esta vía?

### Bibliografía

- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, 2006. Reimpresión año 2007
- FEDUCHI, E, BLASCO I, ROMERO, C, YAÑEZ, E. Bioquímica. Conceptos esenciales, Editorial Panamericana, 1° Edición, 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Editorial Omega, S.A., 5° Edición, 2008.
- LIM, M.Y; ROACH, J. Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Editorial Mosby. 3° Edición. 2010.

---

**TRABAJO PRÁCTICO N° 5**  
**METABOLISMO DE LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS**  
**DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**  
**CICLO DEL GLIOXILATO**

### **OBJETIVOS**

Que el alumno construya los conocimientos que le permitan:

- Comprender las rutas metabólicas de la  $\beta$ -oxidación que permiten a los organismos utilizar los ácidos grasos como fuente de energía y poder reductor.
- Conocer las etapas de la síntesis de ácidos grasos.
- Interrelacionar las vías del metabolismo de lípidos con otras rutas metabólicas.
- Comprender los mecanismos de regulación del metabolismo de ácidos grasos.
- Comprender la secuencia de reacciones y la importancia metabólica del ciclo de glioxilato en los vegetales y microorganismos.

### **INTRODUCCIÓN**

Los lípidos del organismo, al igual que los hidratos de carbono, se hallan en un estado metabólico dinámico, ya que sufren constantemente cambios en las diversas células del cuerpo. Los lípidos comprenden una amplia variedad de sustancias químicas, tales como triglicéridos, ácidos grasos y derivados, fosfolípidos, glucolípidos, etc. Constituyen más del 10 % del peso corporal de un individuo adulto y aproximadamente el 40 % de las calorías de la alimentación diaria. Los lípidos cumplen importantes funciones, entre las que podemos mencionar:

- Fuente de energía.
- Manto térmico. Su presencia en el tejido subcutáneo aísla al cuerpo evitando la pérdida de calor.
- Estructura de las membranas celulares.
- Estructura de hormonas que determinan caracteres sexuales secundarios.
- Aportan ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- Son precursores de varios derivados lipídicos como por ejemplo las sales biliares, hormonas esteroideas, etc.

Las grasas producen por oxidación el doble de energía (9 Kcal/g) que los hidratos de carbono o las proteínas (4 Kcal/g), por lo que representan una importante fuente de energía para los individuos.

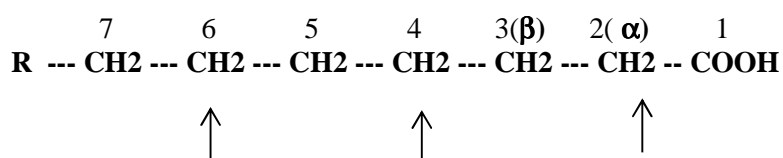
Los lípidos de la dieta, además de ser una fuente importante de energía, proporcionan sensación de saciedad, contribuyen a la palatabilidad de los alimentos y favorecen la absorción intestinal y el transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Para que los lípidos de la dieta puedan ser utilizados por el organismo, deben ser digeridos y absorbidos en el tracto intestinal para

luego ser distribuidos a través del torrente sanguíneo a las células de los distintos tejidos (principalmente hígado y tejido adiposo).

La mayor parte de los lípidos son transportados en la sangre, unidos a proteínas plasmáticas formando complejos denominados “lipoproteínas”. Los triglicéridos unidos a las lipoproteínas son hidrolizados a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos a glicerol y ácidos grasos. El glicerol es transportado al hígado y los ácidos grasos ingresan a las células donde serán almacenados, en forma de triglicéridos, o se degradarán para proveer energía.

### DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

En los mamíferos, el centro principal de acumulación de triglicéridos es el citoplasma de las células del tejido adiposo (adipocitos). El primer paso en la utilización de las grasas almacenadas en adipocitos es la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas reguladas por hormonas. Los ácidos grasos liberados de los triglicéridos deben ser activados previamente a la degradación en el citosol. Luego son transportados a través de la membrana mitocondrial interna, conjugados con carnitina, hasta la matriz mitocondrial donde se produce la oxidación. Los ácidos grasos de cadena larga se oxidan a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en la matriz mitocondrial de casi todos los tejidos de vertebrados. El músculo cardíaco obtiene la mayor parte de su energía de la oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se degradan por eliminación oxidativa sucesiva de dos carbonos a partir del carbono beta del extremo carboxílico en un proceso denominado  $\beta$ -oxidación.



El acetil CoA liberado entra al ciclo de Krebs para terminar de oxidarse a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . A continuación, desarrollaremos en forma detallada los procesos que conducen a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

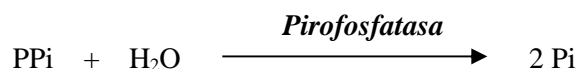
#### Activación y transporte

Las moléculas de ácidos grasos, obtenidas por degradación de triglicéridos, son activadas en el citosol por tioquinasas o acil-CoA sintetisas que catalizan la síntesis de acil-CoA. Existen tres enzimas diferentes siendo cada una de ellas específica para un intervalo de longitud de cadena del ácido graso:

- 1- Activadoras de ácidos grasos de cadena corta: acético, propiónico.
- 2- Activadoras de ácidos grasos de cadena intermedia (entre 4 y 12 átomos de carbono).
- 3- Activadoras de ácidos grasos de cadena larga (más de 12 átomos de carbono), por ej. ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico.

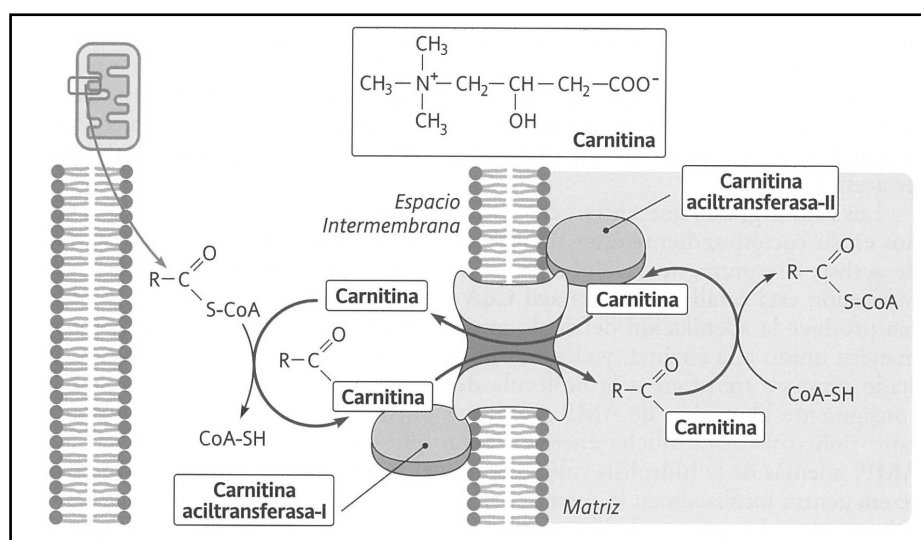


Las dos últimas activan tanto ácidos grasos saturados como insaturados. Las tres enzimas tienen idéntico mecanismo de reacción.



La reacción es irreversible debido a que la hidrólisis del pirofosfato (PPi) asegura que el equilibrio se desplace hacia la formación de acil-CoA. En esta reacción está implicado un intermediario unido a la enzima, que es un anhídrido mixto: acil-AMP o acil adenilato que le permite generar después una unión tioéster de elevada energía. El efecto neto es la utilización o consumo de 2 enlaces ricos en energía del ATP para activar una molécula de ácido graso.

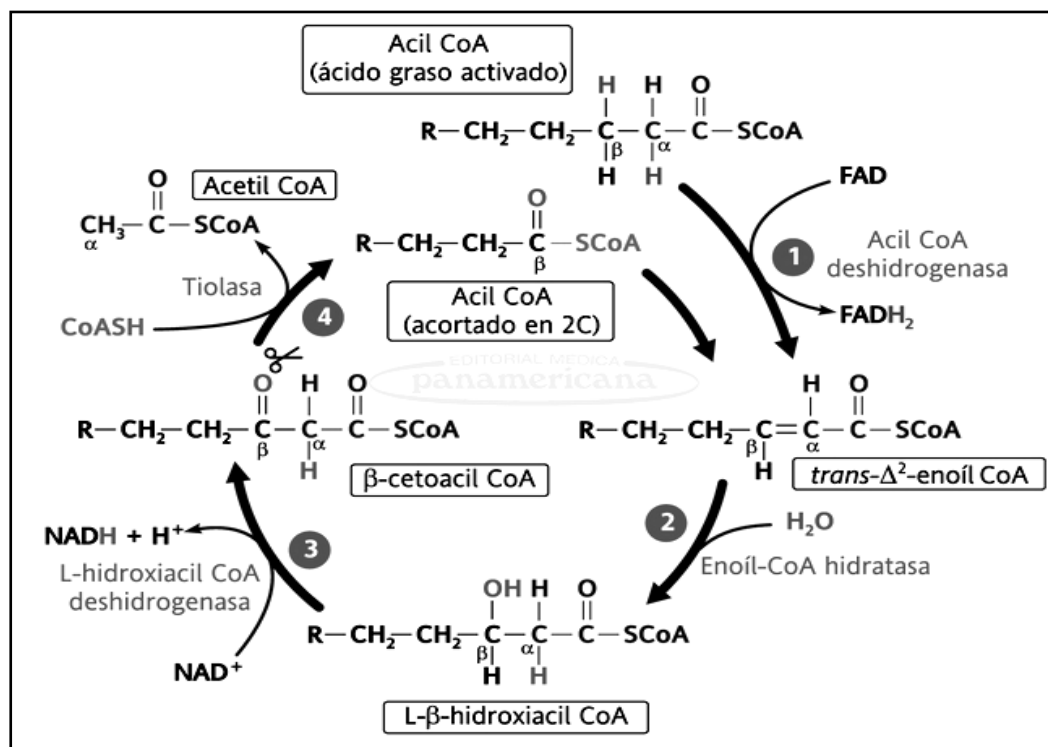
Los ácidos grasos activados de 12 o menos carbonos (presentes en algunos alimentos tales como leche materna y leche de cabra) entran en la mitocondria sin la ayuda de transportadores de membrana. Los ácidos grasos de 14 o más carbonos, que constituyen la mayoría de los obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales. Así, existe un sistema de transporte que permite transferir el grupo acilo hacia la matriz mitocondrial, que es impermeable a los ácidos grasos y a sus derivados CoA. El sistema de transferencia es la lanzadera de la carnitina (figura 5.1) que comprende un contra-transportador carnitina/acilcarnitina y dos enzimas: carnitina-acil transferasa I, ubicada en la cara externa de la membrana interna de la mitocondria y carnitina acil transferasa II, localizada en la faz de la membrana que da a la matriz. La molécula transportadora es la carnitina, sintetizada en humanos en hígado y riñón a partir del aminoácido lisina.



**Fig. 5.1.** Sistema de transporte de ácidos grasos "lanzadera de carnitina", que permite el transporte de ácidos grasos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales", 1ª Edición.

## Oxidación de ácidos grasos saturados

Dentro de la matriz mitocondrial las moléculas de acil-CoA sufren el proceso de  $\beta$ -oxidación (figura 5.2), el cual consiste en una secuencia cíclica de cuatro reacciones: oxidación, hidratación, oxidación y ruptura de la cadena con liberación de acetil-CoA. En cada ciclo de  $\beta$ -oxidación, los productos formados son acetil-CoA y un acil-CoA cuya cadena carbonada posee dos carbonos menos que el inicial. El ciclo de oxidación se repite hasta la completa degradación del acil-CoA y liberación de acetatos activos. Estos últimos, ingresan al ciclo del Krebs para su oxidación final a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 5.2.** Representación esquemática de la oxidación de ácidos grasos. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales", 1ª Edición.

## Balance energético de la oxidación total del ácido palmítico (16 C)

Durante un ciclo de  $\beta$ -oxidación hay dos etapas en las cuales se transfieren hidrógenos, a partir de  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$  a la cadena respiratoria, por lo que el rendimiento total es de 5 moléculas de ATP por ciclo. A su vez, en cada etapa se libera una molécula de acetil-CoA que se incorpora al ciclo de Krebs para producir 12 ATP. Por lo tanto, el rendimiento neto de la oxidación de un ácido graso de por ejemplo dieciséis carbonos, como el ácido palmítico será:

Producción de ATP en la beta-oxidación. Siete ciclos (5x7).....	+ 35
Producción de ATP por oxidación en el ciclo de Krebs (8 acetil-CoA) (12x8).....	+ 96
Consumo para activación inicial.....	- 2
Producción neta de ATP .....	<b>129</b>

A partir del cálculo anterior, comprendemos que a partir de un mol de ácido palmítico se generan 129 moles de ATP. El 40% de la energía libre estándar de la oxidación de palmítico se recupera en forma de fosfato de alta energía.

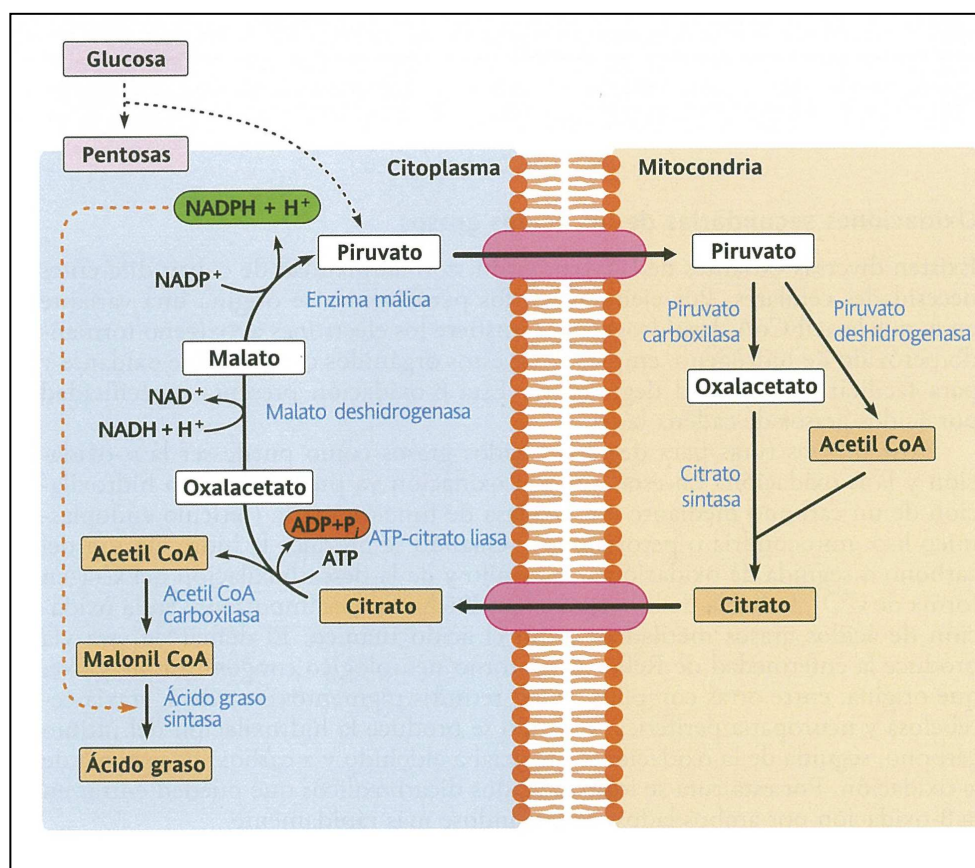
## BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

La síntesis de ácidos grasos, o lipogénesis, consiste en una serie de reacciones cíclicas en las que se construye una molécula de ácido graso mediante la adición secuencial de unidades de dos carbonos derivadas de acetil-CoA. Esta síntesis predomina en órganos y tejidos como hígado, tejido adiposo, glándula mamaria en períodos de lactancia, riñón y pulmón. Es un proceso muy activo cuando la dieta supera las necesidades calóricas, el exceso de acetil-CoA es derivado hacia la síntesis de ácidos grasos. Los precursores de este proceso de biosíntesis son: acetil-CoA y malonil-CoA. El poder reductor lo provee el NADPH proveniente de la vía de las pentosas-fosfato o el ciclo citrato-piruvato (vía de la *enzima málica*) y el principal producto formado es el palmitato libre.

La síntesis completa de ácidos grasos saturados a partir de acetato activo (acetil-CoA), ocurre en el citosol y es sintetizado por un complejo multienzimático citosólico llamado ácido graso sintasa, el sistema está formado por dos subunidades idénticas que funcionan en estrecha asociación. Cada subunidad presenta siete sitios catalíticos y la proteína portadora de restos acilo, denominada “proteína transportadora de acilos” (PTA) o ACP (del inglés: acyl carrier protein). La ACP es una proteína termoestable a la que permanecen unidos los intermediarios que se forman durante la biosíntesis. El grupo acilo en crecimiento es transportado de enzima en enzima, como en un montaje en serie, fijado al ACP tioéster.

En bacterias como la *Escherichia coli* las enzimas del complejo están asociados alrededor de una molécula central de ACP y se pueden separar en las diferentes enzimas conservando su actividad.

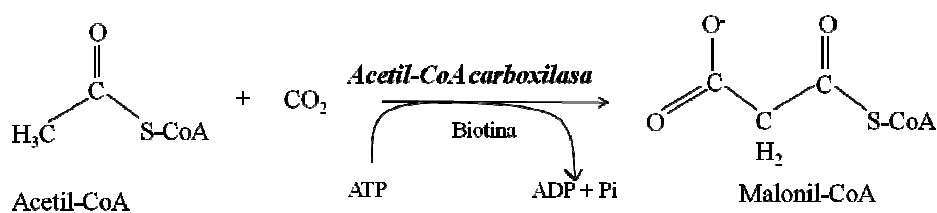
Dado que los ácidos grasos se sintetizan en el citosol a partir de acetil-CoA y que estos restos de dos carbonos se producen en la matriz mitocondrial, es necesario que los acetatos activos sean transferidos al exterior de las mitocondrias. La membrana interna no es permeable a acetil-CoA y el sistema transportador de la carnitina funciona preferentemente con acilos de cadena larga. En este caso, este transporte de los ácidos grasos hacia el citosol ocurre gracias al denominado “ciclo del citrato” (figura 5.3). Las moléculas de acetil-CoA reaccionan con oxalacetato formando citrato, de esta manera abandonan la mitocondria y son liberados para la síntesis de ácidos grasos, el citrato es escindido en reacción catalizada por citrato liasa citosólica, con la participación de coenzima A y ATP. El oxalacetato sufre una serie de reacciones a través de las cuales se transforma en malato o en piruvato, que disponen de transportadores en la membrana mitocondrial. El oxalacetato es reducido a malato por malato deshidrogenasa citosólica y luego descarboxilado a piruvato por la enzima málica, ligada a NADP.



**Figura 5.4.** Ciclo del citrato: Origen del citrato y actuación de la acetil-CoA carboxilasa  
Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales", 1ª Edición.

### Formación de malonil-CoA

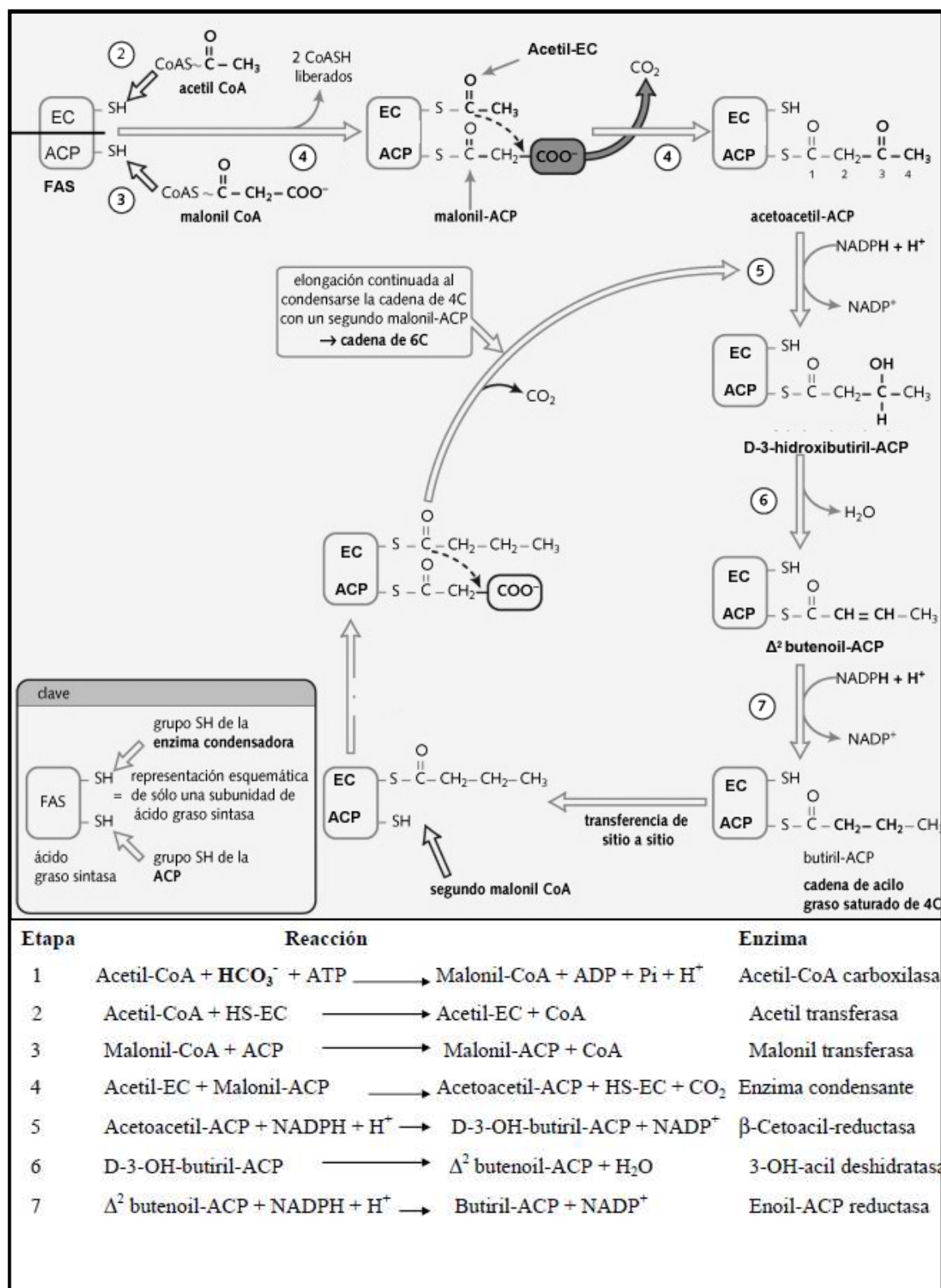
Acetil-CoA reacciona con  $\text{CO}_2$  para formar malonil-CoA por acción de acetil-CoA carboxilasa que utiliza biotina (Vitamina del complejo B) como coenzima, esta coenzima actúa como transportador de  $\text{CO}_2$ .



Esta etapa es irreversible y es limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos. La enzima acetil CoA carboxilasa es alostérica, estimulada por citrato e inhibida por ácidos grasos libres y por acil-CoA de cadena larga como palmitil-CoA. Su actividad está también regulada por hormonas y por la dieta.

### Reacciones de Síntesis de Ácidos Grasos

A continuación, se encuentra un esquema de las reacciones que conducen a la síntesis de palmitato en los organismos superiores y bacterias.



**Figura 5.5.** Reacciones involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos. Modificado desde Benyon, S. "Metabolismo y Nutrición", 3ª Edición.

El producto de esta secuencia de reacciones es butiril-ACP, así se completa el primer ciclo de elongación. En el segundo ciclo el butiril es transferido desde la ACP a la enzima condensante (EC) formándose Butiril-EC, éste se condensa con otra molécula de malonil-ACP y se repite el ciclo para

formar un hexil-ACP. Los ciclos de elongación continúan hasta llegar a palmitil-ACP, el cual se hidroliza por una esterasa para producir palmitato y ACP. Para la síntesis de ácido palmítico se consumen 7 moléculas de ATP y 14 NADPH.

### **Comparación de la Síntesis y Degradación de los ácidos grasos**

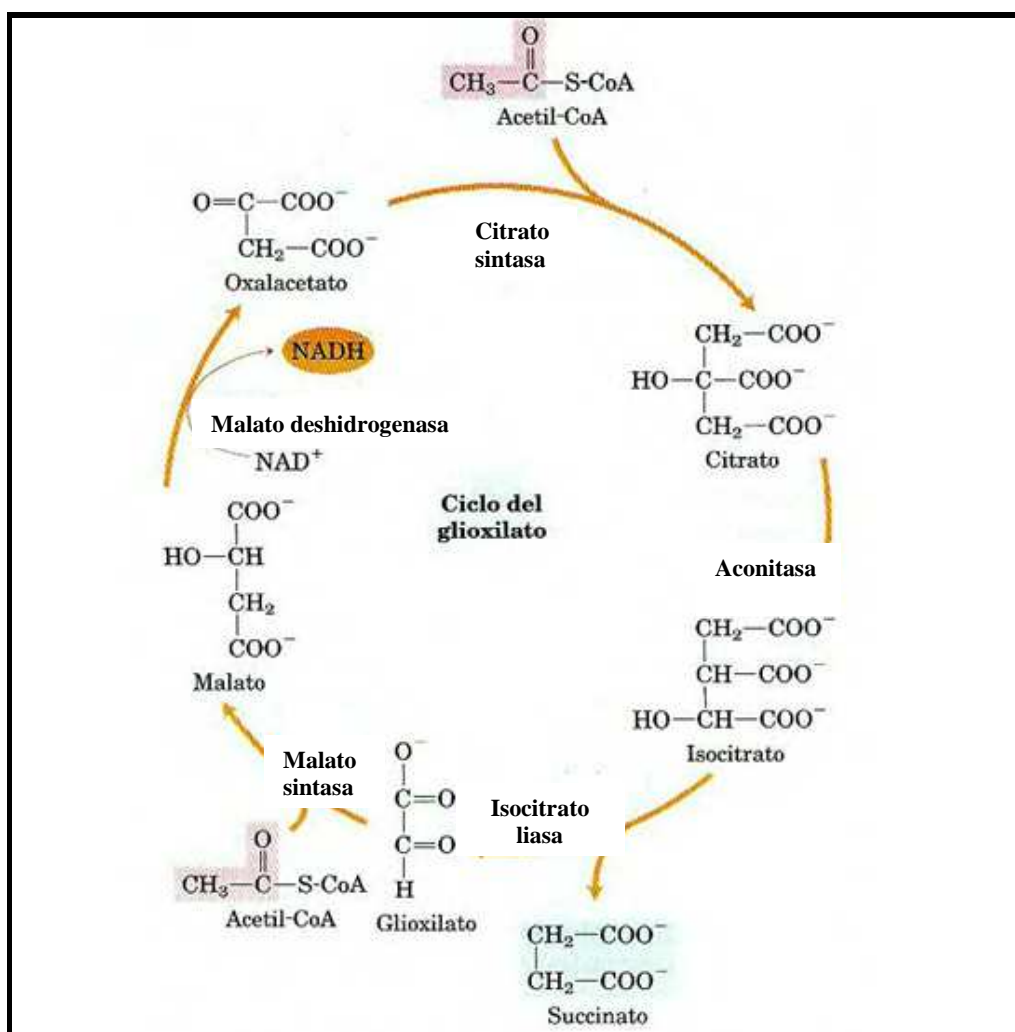
	<b>SÍNTESIS</b>	<b>DEGRADACIÓN</b>
Activa	Tras comidas, situación post-prandial	Ayuno y ejercicio prolongado
Principales tejidos implicados	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
Zona	Citosol	Mitocondria
Donante/ productor de 2C	Acetil-CoA/ Malonil-CoA	Acetil-CoA
Transportador de Ácido Graso activo	Unido a ACP	Unido a CoA
Enzimas	complejo multienzimático: ácido graso sintasa	Probablemente no asociadas.
Oxidante / reductor	NADPH	NAD <sup>+</sup> y FAD
Control alostérico	El citrato activa la acetil-CoA carboxilasa, el palmitil-CoA la inhibe.	Malonil-CoA inhibe la carnitina-acil-transferasa I
Control hormonal	La insulina activa la acetil-CoA carboxilasa, la adrenalina y el glucagón la inhiben.	La adrenalina y el glucagón activan la lipasa, la insulina la inhibe
Producto	Palmitato.	Acetil CoA

### **CICLO DEL GLIOXILATO**

Los vertebrados no pueden utilizar los ácidos grasos o el acetato derivado de ellos como material de partida para sintetizar glucosa mediante gluconeogénesis. Sin embargo, en las plantas, ciertos invertebrados y algunos microorganismos, el acetato puede ser utilizado como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de glúcidos. En estos organismos las enzimas del ciclo del glioxilato (figura 5.6) catalizan la conversión neta de acetato en succinato u otro intermediario de cuatro átomos de carbono del ciclo de Krebs.

Al igual que ocurre en el ciclo de Krebs, en el ciclo del glioxilato el acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para dar citrato que luego es convertido en isocitrato. En este caso, sobre el isocitrato actúa la isocitrato liasa formando succinato y glioxilato. El glioxilato se condensa con una segunda molécula de acetil-CoA para dar malato en una reacción catalizada por malato sintasa. Las enzimas

isocitrato liasa y malato sintasa son específicas del ciclo del glioxilato, mientras que las enzimas restantes son comunes a las enzimas del ciclo de Krebs (son isoenzimas).



**Figura 5.6.** Reacciones que intervienen en el ciclo del glioxilato. Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 4ª Edición.

En cada vuelta del ciclo del glioxilato, se consumen dos moléculas de acetil-CoA, mientras que se produce una molécula de succinato, disponible para fines biosintéticos. El succinato puede convertirse a través de fumarato y malato en oxalacetato, el cual, a su vez, puede transformarse en fosfoenolpiruvato y producir glucosa mediante gluconeogénesis.

---

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN****DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

1- a) Se oxida palmitato ( $9-C^{14}$ ) en condiciones de funcionamiento del ciclo de Krebs. ¿Cuál será la localización del  $^{14}C$  en los siguientes compuestos?

- Acetil-CoA.
- Citrato. Considérese tan solo una vuelta al Ciclo de Krebs.
- Butiril-CoA.

b) Si el ácido palmítico sólo estuviera marcado en posición de  $C_{15}$  y  $C_{16}$  al degradarse por beta-oxidación la unidad de acetil-CoA marcada sería la producida:

- a partir de la ruptura tiolítica del beta-cetopalmitil-CoA
- a partir de la ruptura tiolítica de acetoacetil-CoA

2- Con respecto a la  $\beta$ -oxidación del ácido esteárico (18 C), responda:

- ¿Cuántos ciclos son necesarios para oxidarlo hasta acetil-CoA cuántos se producen?
- ¿Cuántos ATP se generan? Considere el proceso de activación.
- Calcule el rendimiento de ATP cuando el ácido es oxidado completamente hasta  $CO_2$  y  $H_2O$ .

3- Demostrar que el rendimiento de ATP por la oxidación de un ácido graso de 6 carbonos es mayor que el de una hexosa. Considerar que el catabolismo procede hasta  $CO_2$  y  $H_2O$ .

4- Suponga que tuviera que subsistir con una dieta consistente en grasa de ballena y foca, sin prácticamente ningún aporte de glúcidos.

- ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?
- Si la dieta no contiene glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar?

**BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS**

5- Suponiendo que se incubaba homogenato de tejido que posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y también NADPH, ATP,  $CO_3H^-$  y  $2-^{14}C$ -piruvato ¿Cuáles serán los átomos de carbono que resultarán marcados en el ácido palmítico?

6- ¿Cuál de los siguientes compuestos puede servir para la síntesis neta de ácidos grasos en el organismo de la rata? ¿Cuántos átomos de carbono de cada uno de ellos pueden ser convertidos en carbonos de ácidos grasos?

a- Fructosa

b- Sacarosa

c- Bicarbonato de sodio

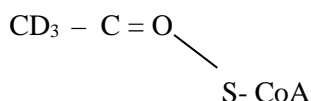
---



**7-** Cuántas moléculas de glucosa se convierten en ribulosa-5-P cuando una molécula de ácido palmítico se sintetiza a partir de acetil-CoA? Considere que los carbonos del oxalacetato producido por el clivaje del citrato, regresan a la mitocondria a través de malato y no por el piruvato que podría obtenerse por acción de la enzima málica.

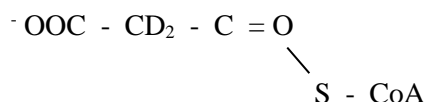
**8-** Considérese una preparación que contiene todas las enzimas y los cofactores necesarios para la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetil CoA y malonil CoA que se han añadido.

**a)** Si la molécula de acetil CoA marcada con deuterio (isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil CoA se añaden como sustrato.



- ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?
- ¿Cuáles son sus localizaciones? Explicar.

**b)** Si se añaden como sustratos acetil CoA sin marcar y malonil CoA marcada con deuterio



- ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?
- ¿Cuáles serán sus localizaciones? Explicar.

## CICLO DEL GLIOXILATO

**9-** Se ha observado que durante el crecimiento de varios hongos patógenos de plantas hay una elevada expresión de la enzima isocitrato liasa. Estos hongos ven favorecido su desarrollo, con respecto a otras especies, en condiciones de baja concentración de glucosa, baja tensión de oxígeno y altos niveles de acetato.

**a)** ¿Cómo explica que una mayor expresión de isocitrato liasa favorezca el desarrollo de estos hongos en las condiciones mencionadas?

El ciclo del glioxilato también es llevado a cabo en semillas en germinación.

**b)** ¿Cuál sería la principal fuente de carbonos en ese caso?

**c)** ¿Qué organelas estarían implicadas?

**d)** Explique el sentido general de ciclo del glioxilato. ¿Considera que se trata de una vía anabólica o catabólica?

---

## GUIA DE ESTUDIO

### Degradación de Ácidos Grasos

- Esquematice la primera secuencia de reacciones de la degradación de palmitoil-CoA, mencionando las enzimas que intervienen.
- ¿Qué enzima interviene en el proceso de activación de un ácido graso? ¿Cuántas uniones de alta energía se gastan en este proceso? Formular la reacción.
- ¿Cómo se transporta el ácido graso desde el citosol a la mitocondria?
- ¿Cuáles son las coenzimas que intervienen en el proceso de  $\beta$ -oxidación?
- ¿En qué lugar de la célula ocurre el proceso de degradación de los ácidos grasos?
- ¿Cuáles son los productos de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono?
- ¿Cuántos ATP y cuántas moléculas de acetil-CoA se producen por degradación de un ácido graso de 12 átomos de carbono hasta acetil-CoA? ¿Ídem hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O?
- ¿En qué procesos metabólicos pueden utilizarse los carbonos provenientes de la degradación de los ácidos grasos?

### Ciclo del glioxilato

- ¿En qué tipo de organismos ocurre y cuál es su objetivo?
- Localización celular. Esquema de las reacciones implicadas.
- Diferencias con el Ciclo de Krebs.

### Biosíntesis de Ácidos Grasos

- Esquematizar las etapas de la síntesis de ácidos grasos indicando las enzimas correspondientes.
- ¿Cuál es el intermediario del Ciclo de Krebs que transporta los grupos acetatos desde la mitocondria al citosol?
- ¿Cuál es la etapa limitante de la velocidad de reacción y cuáles son los moduladores de la enzima?
- ¿Cuáles son los precursores de la síntesis de ácidos grasos?
- ¿Cuántas moléculas de NADPH y ATP se requieren para sintetizar palmitoil-ACP?
- ¿De dónde proviene el NADPH?

## BIBLIOGRAFÍA

- FEDUCHI, E, BLASCO I, ROMERO, C , YAÑEZ, E. Bioquímica. Conceptos esenciales, Editorial Panamericana, 1º Edición, 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Editorial Omega, S.A., 4º Edición, 2006. Reimpresión año 2008.
- BENYON S, "Lo esencial en metabolismo y nutrición", Editorial Harcourt Brace, 3º Edición, 2010.

---

**TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6**  
**METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS**  
**DEGRADACION DE AMINOACIDOS**

**OBJETIVOS**

Que el alumno sea capaz de:

- Comprender el proceso de degradación de los aminoácidos como fuente de energía para los organismos.
- Conocer los mecanismos de degradación de aminoácidos: transaminación, desaminación oxidativa, destino del grupo amino y de los esqueletos carbonados.
- Comprender la vía de eliminación del amoníaco a través del ciclo de la urea, las reacciones y enzimas involucradas, regulación, origen de los precursores, localización intracelular, balance energético.
- Interrelacionar el metabolismo de los aminoácidos con otras vías metabólicas.
- Entender la importancia de los aminoácidos por sus funciones precursoras y valorar su papel fisiológico en los organismos.

**INTRODUCCION**

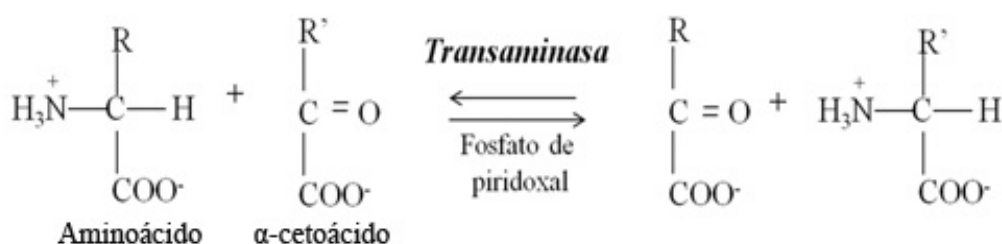
La función fundamental de las proteínas en la dieta es la de proporcionar nitrógeno aminoacídico para la síntesis de nuevas proteínas y otros compuestos nitrogenados no proteicos. En los mamíferos, las proteínas de los alimentos son digeridas por enzimas proteolíticas del tracto intestinal, a péptidos pequeños o aminoácidos libres.

Entre las enzimas proteolíticas podemos mencionar: la pepsina presente en el jugo gástrico, proteasas segregadas por el páncreas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas A y B, elastasa) y por las células de la mucosa intestinal (aminopeptidasas, dipeptidasas).

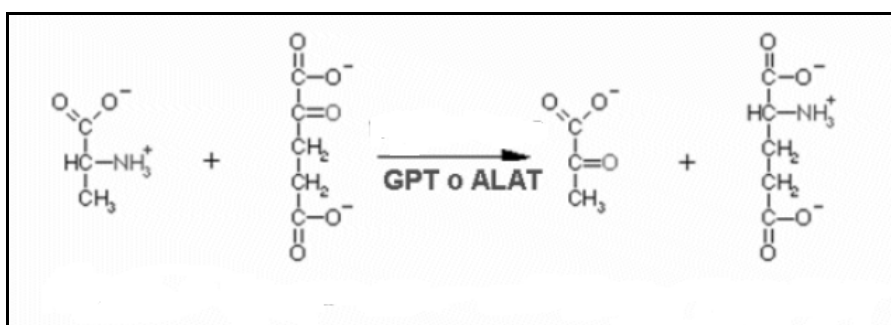
Los aminoácidos libres y los péptidos pequeños se absorben a través de las células de la mucosa intestinal. Existen mecanismos específicos de absorción, que incluyen transportadores de membrana para aminoácidos ácidos, básicos y neutros. Los péptidos absorbidos son hidrolizados a aminoácidos en el interior de la célula intestinal, los cuales pasan luego a la vena porta para su transporte al hígado u otros tejidos.

Además de su rol primario en la síntesis de proteínas tisulares, los aminoácidos pueden ser convertidos en otros metabolitos esenciales o ser degradados a sus esqueletos carbonados tras la eliminación del grupo amino. Los restos carbonados pueden convertirse en otros metabolitos (glucosa, cuerpos cetónicos, etc.) u oxidarse mediante el ciclo de Krebs, para producir CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y ATP. La pérdida del grupo amino ocurre por dos rutas principales: transaminación y desaminación oxidativa.

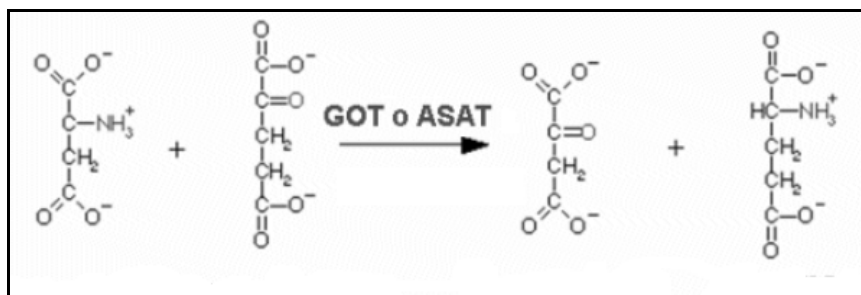
La ecuación general de transaminación puede representarse:



Uno de los  $\alpha$ -cetoácidos implicados con mayor frecuencia en las reacciones de transaminación es el  $\alpha$ -cetoglutarato. Cuando éste recibe el grupo amino cedido por alanina la reacción es catalizada por la enzima alanina-amino transferasa (ALAT) también conocida como glutámico-pirúvico transaminasa (GPT).



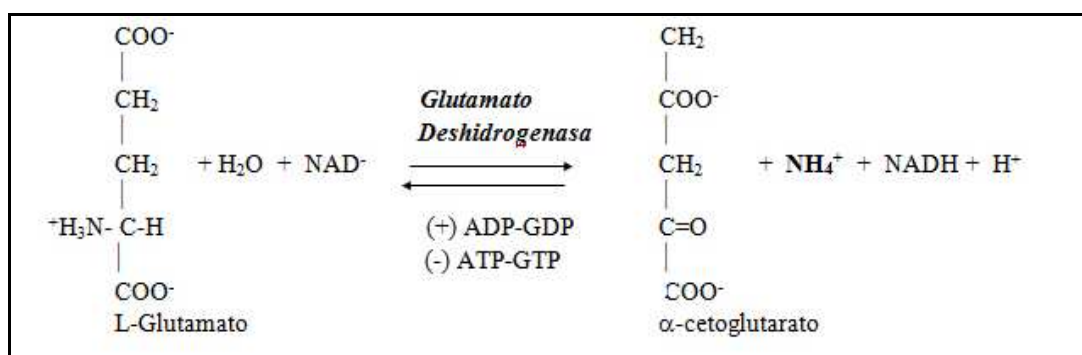
Cuando el proceso de transaminación ocurre entre  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato, la enzima que cataliza esta reacción es la aspartato-amino transferasa (ASAT), también conocida como glutámico-oxalacético transaminasa (GOT).



A diferencia de las reacciones de transaminación, en las cuales hay una transferencia del grupo amino de los aminoácidos hacia un alfa-ceto ácido, uno de los procesos de pérdida del grupo amino ocurre a través de la reacción de desaminación oxidativa. La reacción de desaminación oxidativa es catalizada por la enzima mitocondrial glutamato deshidrogenasa, la cual cataliza reversiblemente la separación del grupo amino del glutamato. El amoníaco liberado puede unirse al  $\alpha$ -cetoglutarato para generar L-glutamato, por lo tanto, sirve también como una vía de síntesis. La enzima utiliza como coenzima al NAD y al NADP. En la reacción directa generalmente participa el  $\text{NAD}^+$  y se forma  $\alpha$ -cetoglutarato y amoníaco. Esta es una enzima

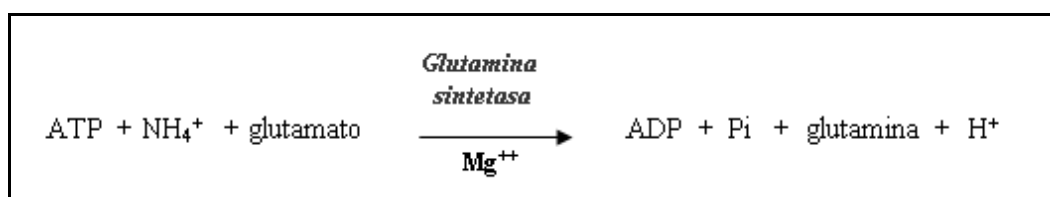
alostérica siendo sus moduladores positivos ADP y GDP y sus moduladores negativos ATP y GTP.

El amoníaco a pH fisiológico capta un protón y se convierte en ion amonio; ambos compuestos nitrogenados son altamente tóxicos, sobre todo a nivel de cerebro. Una de las posibles razones de su toxicidad se debería a que, al aumentar los niveles de amoníaco en las mitocondrias, se invierte la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa hacia la formación de L-glutamato. El  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs, va desapareciendo y, por consiguiente, se deprime esta vía de oxidación y la formación de ATP, indispensable para el cerebro.



En la mayoría de los vertebrados terrestres, el  $\text{NH}_4^+$  generado por desaminación oxidativa, es transformado en urea, metabolito no tóxico que es excretado. Sin embargo, esta transformación ocurre en hígado, por lo tanto, el amoníaco de tejidos periférico debe ser transportado hasta este órgano, o bien, hacia riñón, en donde se excreta como tal. Como el amoníaco es tóxico, es transformado primero en glutamina, compuesto no tóxico, y bajo esa forma es transportado hacia hígado y riñón (figura 6.1).

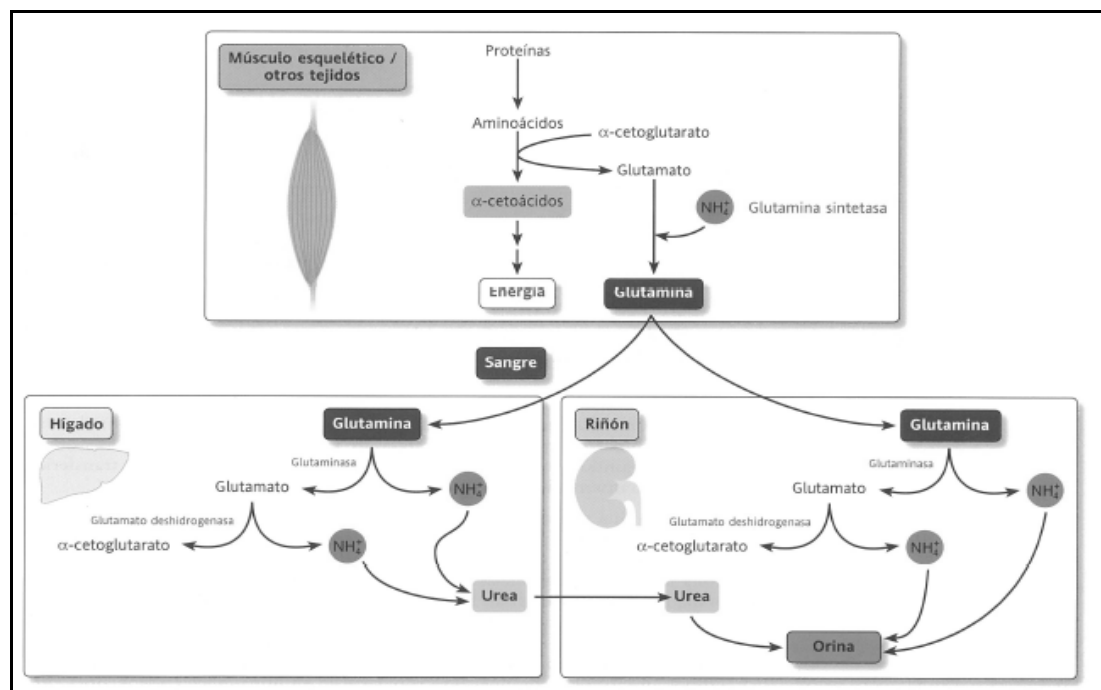
La síntesis de glutamina tiene lugar por acción de la enzima glutamina sintetasa que cataliza la siguiente reacción:



En la mayor parte de los animales, la glutamina es transportada por vía sanguínea hasta el hígado en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la enzima glutaminasa. Esta enzima también se encuentra en los túbulos renales.



En la mayoría de los vertebrados terrestres, el  $\text{NH}_4^+$  así formado se convierte en urea en el hígado, a través del ciclo de la urea, y luego ésta es excretada con la orina.



**Fig. 6.1.** Transporte de Nitrógeno al hígado y al riñón. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 1ª Edición.

### Ciclo de la urea

Los átomos de nitrógeno de los grupos alfa amino, separados de los aminoácidos durante su degradación oxidativa, son excretados por orina en forma de urea, amoníaco o ácido úrico, según la especie.

La formación de urea tiene lugar en el hígado y es catalizada por una secuencia de reacciones enzimáticas que se denomina ciclo de la urea (figura 6.2). En este ciclo se utiliza el amoníaco que proviene de las reacciones de la enzima glutaminasa o de desaminación oxidativa y  $\text{CO}_2$ , y se incorpora luego otro resto amino proveniente del aspartato. La urea es transportada por la sangre a los riñones y se elimina por orina (figura 6.1).

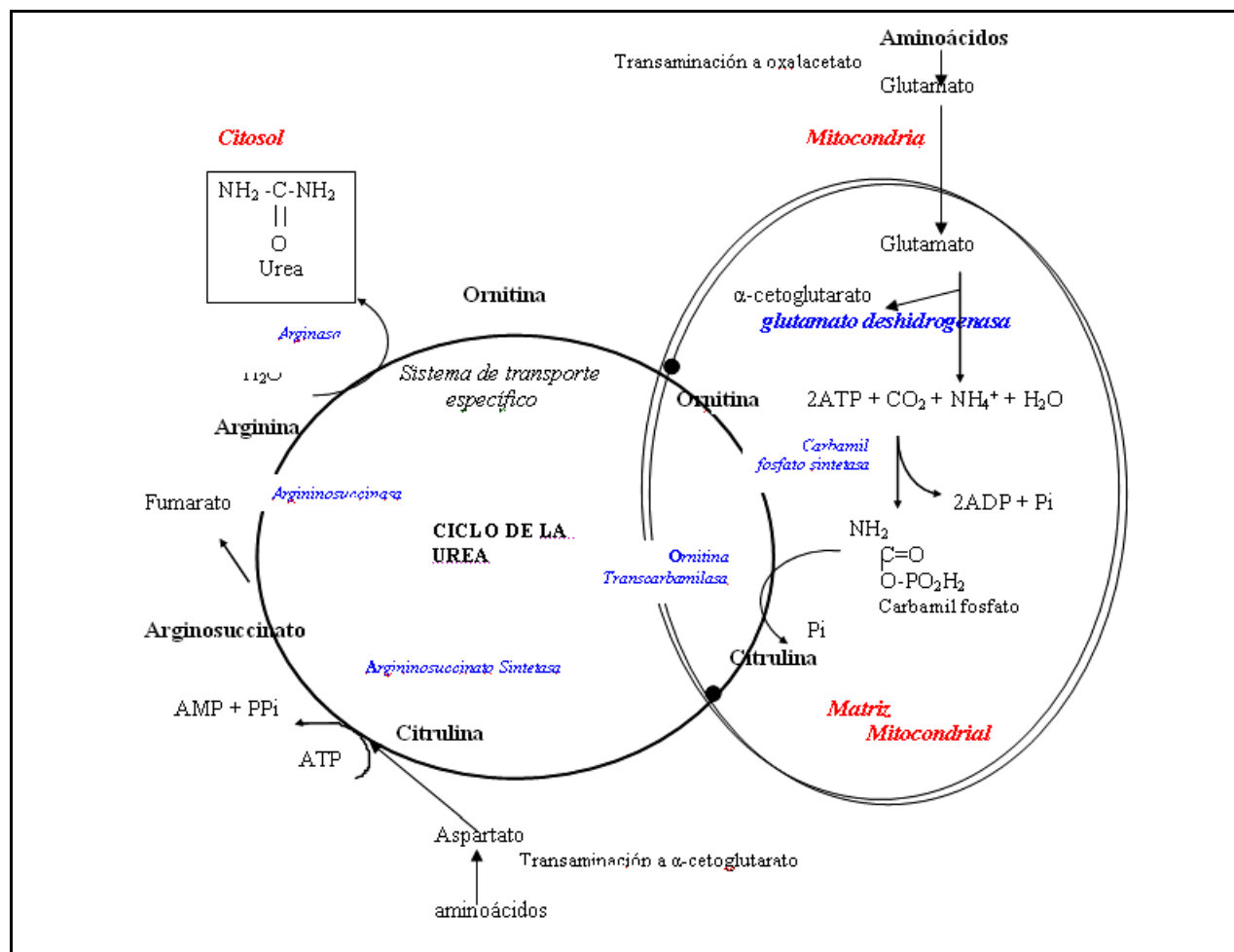


Figura 6.2. Representación esquemática del ciclo de la urea.

### Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos

Para la degradación existen secuencias multienzimáticas que convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen a piruvato, acetil-CoA o a los intermediarios del ciclo de Krebs, de acuerdo al esquema de la figura 6.3.

De acuerdo con el mencionado esquema, los aminoácidos pueden ser clasificados como:

- 1- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **piruvato**: alanina, cisteína, glicina, serina y treonina.
- 2- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **acetoacetyl-CoA**: fenilalanina, tirosina, lisina, leucina y triptófano.
- 3- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **oxalacetato**: asparagina y ácido aspártico.
- 4- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **succinil-CoA**: isoleucina, metionina y valina.
- 5- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en  **$\alpha$ -cetoglutarato**: ácido glutámico, glutamina, histidina, arginina y prolina.
- 6- La ruta del **fumarato** es seguida por algunos átomos de carbono de la tirosina y la fenilalanina

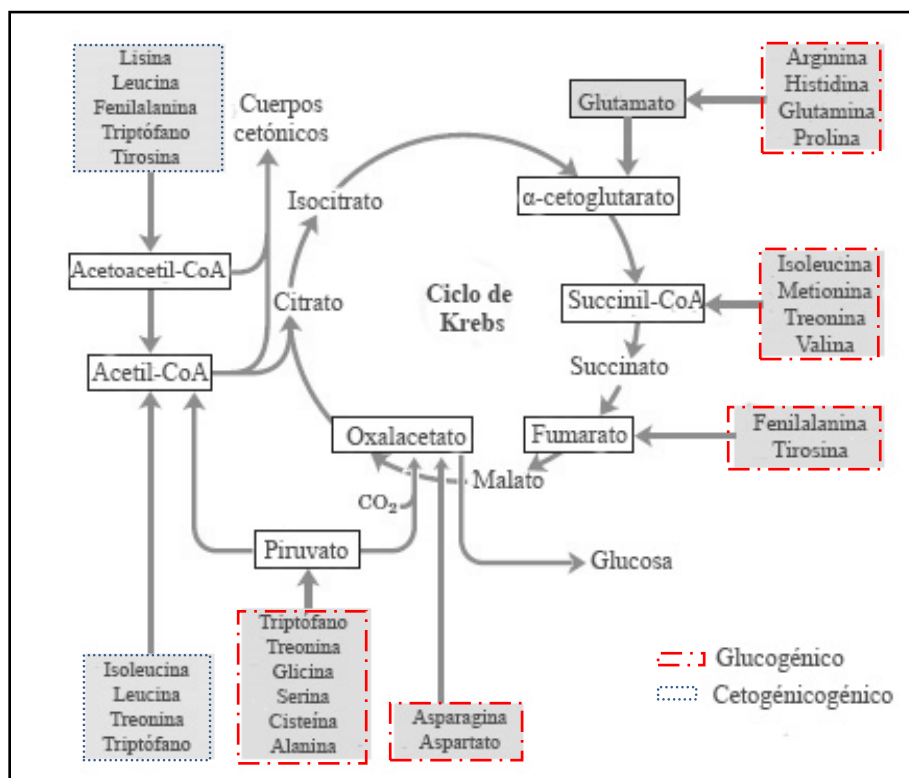
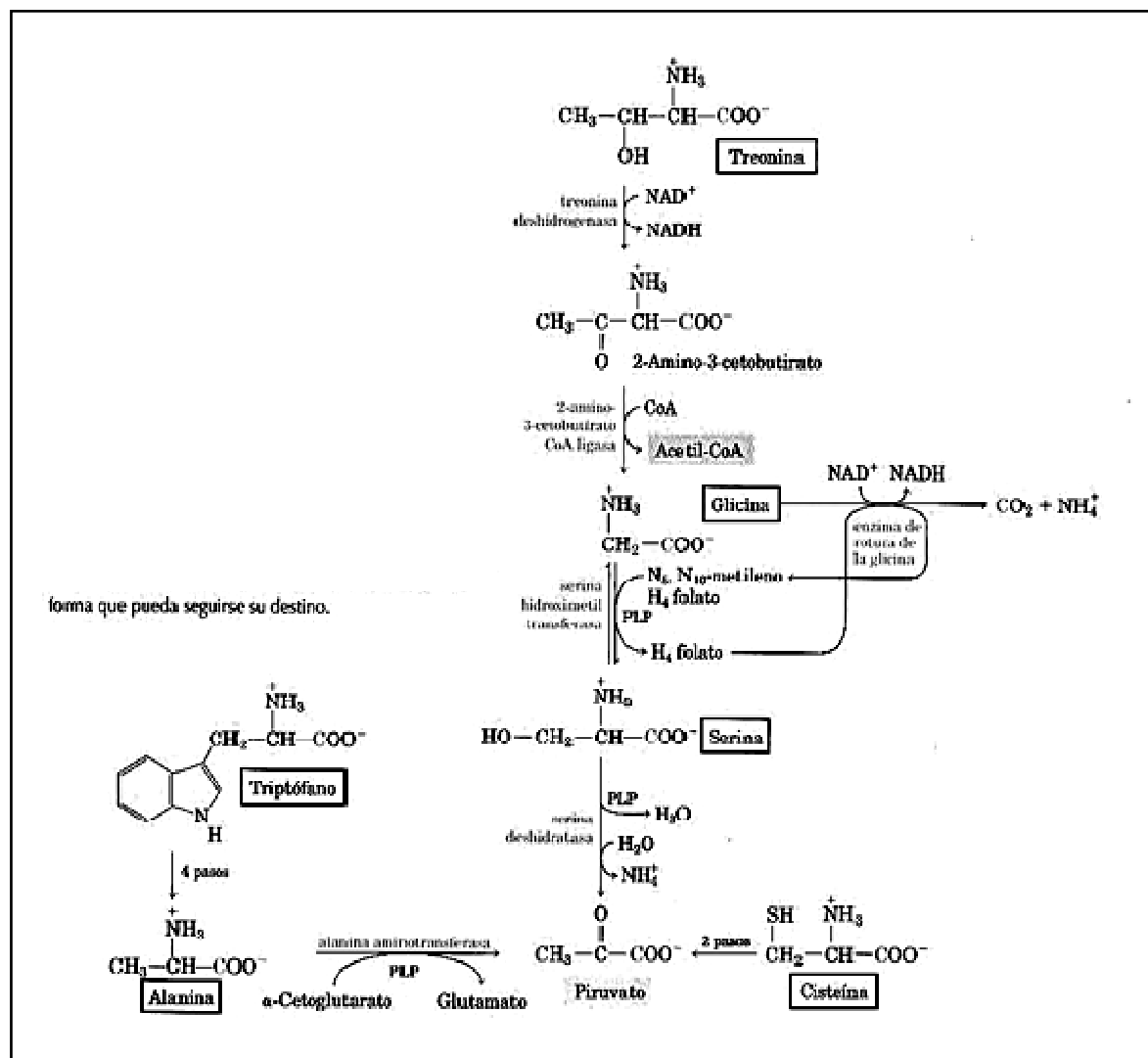


Fig. 6.3. Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos.

### Degradación de aminoácidos a piruvato

El esqueleto carbonado de seis aminoácidos es convertido en parte, o totalmente en piruvato (figura 6.4). El piruvato luego puede ser transformado en acetyl-CoA y eventualmente, ser oxidado en el ciclo de Krebs, o bien, en oxalacetato y desviado a gluconeogénesis. Los aminoácidos que pueden ser transformados en piruvato son alanina, triptófano, cisteína, serina, glicina y treonina (figura 6.3). Alanina es convertida en piruvato, por transaminación directa con  $\alpha$ -cetoglutarato, y la cadena lateral de triptófano es clivada para originar alanina, y a su vez, piruvato. Cisteína es convertida en piruvato luego de dos pasos; en el primero se remueve el átomo de azufre, y en el otro ocurre una reacción de transaminación. Serina es transformada en piruvato mediante la acción de una serina deshidratasa, reacción en la cual piridoxal fosfato actúa como coenzima. El aminoácido glicina es degradado a través de tres vías diferentes, de las cuales una permite la obtención de piruvato. Así, glicina se convierte en serina mediante la adición enzimática del grupo hidroximetilo. En este caso, interviene una hidroximetil transferasa que requiere fosfato de piridoxal y tetrahidrofolato como coenzimas. Serina, es metabolizada a piruvato como ya fue descripto más arriba. En la segunda vía de degradación de glicina, que predomina en animales, este aminoácido es clivado oxidativamente a CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> y un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-)

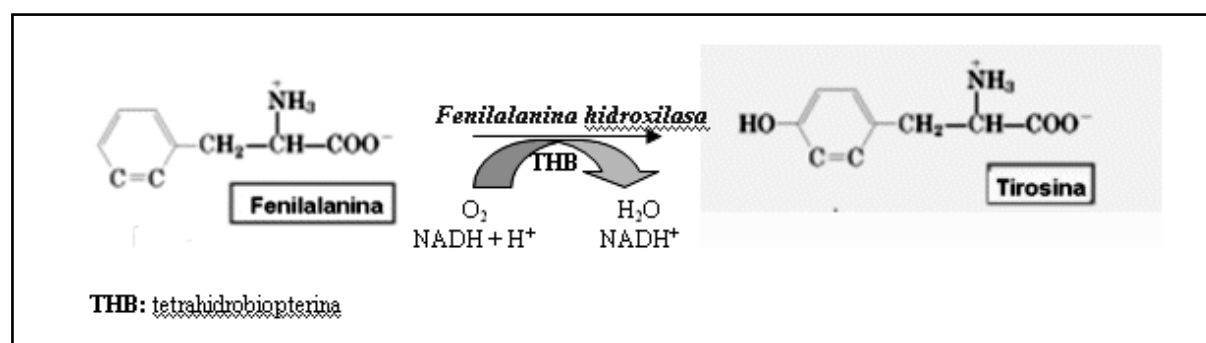




**Figura 6.4.** Degradación de los seis aminoácidos para generar piruvato. Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 4ª Ed.

### Catabolismo de aminoácidos aromáticos: fenilalanina y tirosina

El aminoácido fenilalanina se convierte en tirosina mediante una reacción irreversible catalizada por fenilalanina hidroxilasa.



En la enfermedad hereditaria denominada fenilcetonuria, existe un déficit de la enzima fenilalanina hidroxilasa. En esta situación, fenilalanina se acumula y transamina, formando el

cetoácido fenil-piruvato. Este compuesto origina luego fenil-acetato y fenil-lactato, los cuales son excretados en grandes cantidades por los pacientes que padecen esta patología. Por prevención es obligatorio el diagnóstico de esta deficiencia enzimática en todos los recién nacidos, ya que la falta de un tratamiento adecuado y a tiempo, conduce a afectación del sistema nervioso y la consecuente alteración de las funciones intelectuales.

### Funciones precursoras de los aminoácidos: conversión a productos especializados

La síntesis proteica es la función sintética principal de los aminoácidos, desde un punto de vista cuantitativo, pero además sirven como precursores de otros compuestos nitrogenados. Los compuestos derivados de aminoácidos, fisiológicamente muy importantes, constituyen los llamados péptidos bioactivos que incluyen al hemo, purinas, pirimidinas, hormonas, neurotransmisores. Estos compuestos tienen gran importancia médica o farmacológica.

**Glicina:** la molécula entera de glicina es utilizada para la síntesis de purinas. El C  $\alpha$  y el N se emplean en la síntesis del hemo. Este aminoácido también es precursor de la síntesis de glutatión.

**Histidina:** es precursora de la síntesis de histamina por descarboxilación. En los tejidos de mamíferos esta reacción es catalizada por una descarboxilasa (L-aminoácido aromático descarboxilasa) que también cataliza también la descarboxilación de fenilalanina, tirosina, triptófano y DOPA. Está presente en riñón y otros tejidos y emplea fosfato de piridoxal como coenzima.



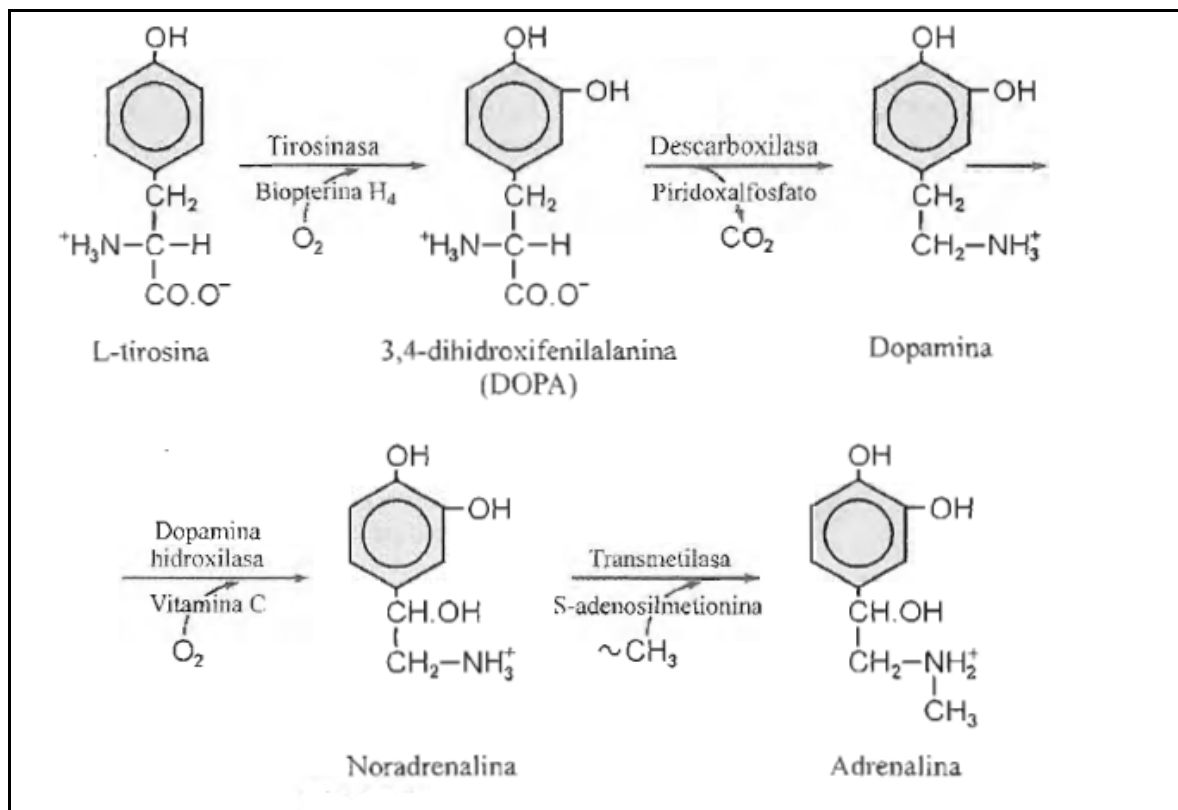
La histamina es una amina biógena de gran actividad fisiológica. Disminuye la presión sanguínea, pudiendo provocar un colapso vascular si es suministrada en grandes dosis. Estimula la secreción de HCl y pepsina en el estómago.

**Tirosina y triptófano:** a partir de estos aminoácidos por descarboxilación se obtiene tiramina y triptamina respectivamente, ambas aminas con acción vasoconstrictora.

Triptófano además es precursor de muchos compuestos de fundamental importancia para el hombre. Una de las vías que puede seguir este aminoácido comprende su hidroxilación en el C5, formando así 5-hidroxitriptófano, el cual en una segunda etapa se descarboxila y forma 5-hidroxitriptamina, también llamada serotonina, un poderoso vasoconstrictor y estimulante de la contracción del músculo liso.

**Ácido glutámico:** por descarboxilación, se forma el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La enzima que cataliza esta reacción se encuentra preferentemente en la sustancia gris del sistema nervioso central. El GABA es un intermediario químico regulador de la actividad neuronal. Actúa como inhibidor de la transmisión del impulso nervioso. Su deficiencia provoca cuadros de epilepsia. Farmacológicamente el GABA se utiliza para el tratamiento de epilepsia y de hipertensión.

**Fenilalanina y tirosina:** pueden seguir una vía metabólica que conduce a la síntesis de sustancias de gran actividad fisiológica llegando a la formación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina)



**Figura 6.5.** Reacciones químicas involucradas en la síntesis de catecolaminas a partir de tirosina. Blanco, "Química Biológica", 8° Ed.

Tirosina también es precursor de la melanina, pigmento que da color a la piel y el pelo, y de las hormonas tiroideas: triiodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>).

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) Nombrar los  $\alpha$ -cetoácidos que se forman por transaminación de los siguientes aminoácidos:

- a- Aspartato
- b- Glutamato
- c- Alanina
- d- Fenilalanina

2) Dos grupos de ratas fueron alimentadas con  $^{15}\text{N}$ -aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorocitrato, que es un inhibidor de la aconitasa). Después de tres días, los animales fueron sacrificados, las proteínas hepáticas hidrolizadas, y el glutamato se determinó por la presencia del  $^{15}\text{N}$ . Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Grupo con $^{15}\text{N}$ -aspartato	Grupo con $^{15}\text{N}$ -aspartato y fluoracetato
Glutamato aislado % de $^{15}\text{N}$	0,65	0,12

Explicar la disminución de la incorporación de  $^{15}\text{N}$  en el glutamato del segundo grupo.

3) Los tres carbonos del lactato y de la alanina poseen estados de oxidación idénticos, y los animales pueden utilizar cualquiera de ellos como fuente carbonada para combustible metabólico. Compare el rendimiento neto en ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa (a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) del lactato frente a la alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.

4) Se realizó un cultivo de hepatocitos de rata, durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$ , y se colocaron diferentes compuestos, determinando a su vez, la producción de arginina y malato. Los compuestos agregados, y las concentraciones de arginina o malato obtenidas, se resumen en la siguiente tabla:

Sustancia agregada					Sustancia aislada	
L-aspartato 20 $\mu\text{M}$	Glutamato 20 $\mu\text{M}$	Oxalacetato 30 $\mu\text{M}$	Citrulina 20 $\mu\text{M}$	Fosfoenol piruvato	Arginina	Malato
+	-	-	+	+	14,4	14,5
+	-	-	-	+	0,0	0,0
+	-	-	+	-	0,9	1,0
-	+	+	+	+	7,0	6,8
-	+	-	+	+	0,0	0,0
-	+	+	-	+	0,0	0,1
-	-	+	+	+	0,0	0,2

La mezcla de incubación fue la siguiente: ATP 4  $\mu$ M, sulfato de magnesio 13  $\mu$ M y buffer fosfato pH 7,5. La arginina se estimó como urea debido a la acción de la enzima arginasa.

¿Qué conclusiones puede obtener de estos datos?

## GUIA DE ESTUDIO

### Degradación de aminoácidos

- Formule las dos reacciones mediante las cuales los aminoácidos pierden su grupo amino.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan estas reacciones?
- ¿Cuáles son los inhibidores y activadores alostéricos de la enzima glutamato deshidrogenasa?
- Formule las reacciones de transaminación de GOT Y GPT.
- ¿Cuál es el cofactor que utilizan las transaminasas y cómo actúa?
- ¿Cómo se sintetiza glutamina? Formule la reacción completa.
- ¿Mediante qué reacciones la glutamina se transforma en un intermediario del Ciclo de Krebs?
- Esquematice la reacción de fenilalanina a tirosina indicando enzima y cofactor.
- ¿En qué vías metabólicas pueden utilizarse los productos de degradación de los aminoácidos?
- ¿Qué intermediarios del ciclo de Krebs se forman por degradación de cada uno de los aminoácidos?
- ¿Cuáles son los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos?

### Ciclo de la urea

- ¿En qué órganos se lleva a cabo el ciclo de la urea?
- ¿En qué lugar de la célula ocurren las diferentes reacciones del ciclo y qué funciones cumple?
- ¿Cuáles son las dos reacciones que permiten la eliminación del grupo amino de los aminoácidos y su entrada al ciclo de la urea como ion amonio?
- ¿De cuáles aminoácidos provienen los nitrógenos de la urea?
- ¿De qué reacción proviene el primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea en forma de amoníaco libre?
- ¿Cuáles son las reacciones que consumen energía y cuántos enlaces ricos en energía se gastan en cada una de ellas?
- ¿Qué productos de deshecho se eliminan por el ciclo de la urea?

## BIBLIOGRAFÍA

- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, Bs.As., 2006. Reimpresión año 2007.
- FEDUCHI, E., BLASCO I, ROMERO, C. , YAÑEZ, E. "Bioquímica. Conceptos esenciales", Ed. Panamericana, 1° Edición, 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4° Edición, 2006. Reimpresión año 2008.

---

## BIOSÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS

### OBJETIVOS

Que el alumno sea capaz de:

- Comprender los fundamentos de la síntesis de las bases nitrogenadas y de los nucleótidos y desoxinucleótidos, como precursores de ácidos nucleicos.
- Reconocer los precursores de la síntesis del núcleo de purina y pirimidina.
- Interrelacionar el metabolismo de los nucleótidos con otras vías metabólicas.
- Comprender los mecanismos de regulación de la síntesis de nucleótidos.
- Abstraer la importancia de la recuperación de bases púricas y pirimidínicas.
- Conocer y comparar la degradación de los nucleótidos púricos y pirimidínicos en diversos organismos.

### INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de los desoxirribonucleótidos y de los ribonucleótidos, constituye un proceso fundamental en todas las células, puesto que los nucleótidos son los precursores directos del DNA y del RNA, y además muchos participan en el metabolismo como coenzimas.

Un aspecto importante de la biosíntesis de los nucleótidos lo constituye la ruta de formación de sus bases: las pirimidinas y las purinas.

Tanto los nucleótidos como sus bases nitrogenadas se emplean con economía, en la mayoría de los organismos no se utilizan como fuente de energía.

Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos son sintetizados a partir de compuestos sencillos y en la mayor parte de los organismos siguen la misma vía (solamente algunas bacterias requieren bases púricas o pirimidínicas preformadas).

Estas vías de biosíntesis de los nucleótidos están sometidas a estrictos mecanismos de control a través de enzimas alostéricas. Dado que los cuatro desoxirribonucleótidos principales y los cuatro ribonucleótidos fundamentales se hallan insertados en el DNA y en el RNA de las células según relaciones molares específicas, dichos mecanismos reguladores se adecuan para lograr una proporción de nucleótidos conveniente para cada tipo de ácido nucleico y para cada tipo de célula.

Tanto el DNA como el RNA son polinucleótidos constituidos cada uno por:

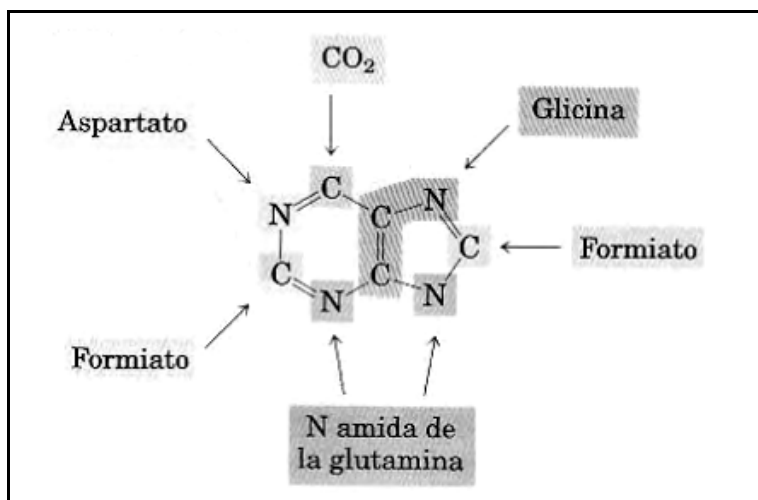
- una base nitrogenada
- un grupo fosfato
- una pentosa

En el DNA la pentosa es la 2-D-desoxirribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son timina y citosina.

En el RNA la pentosa es la D-ribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son uracilo y citosina.

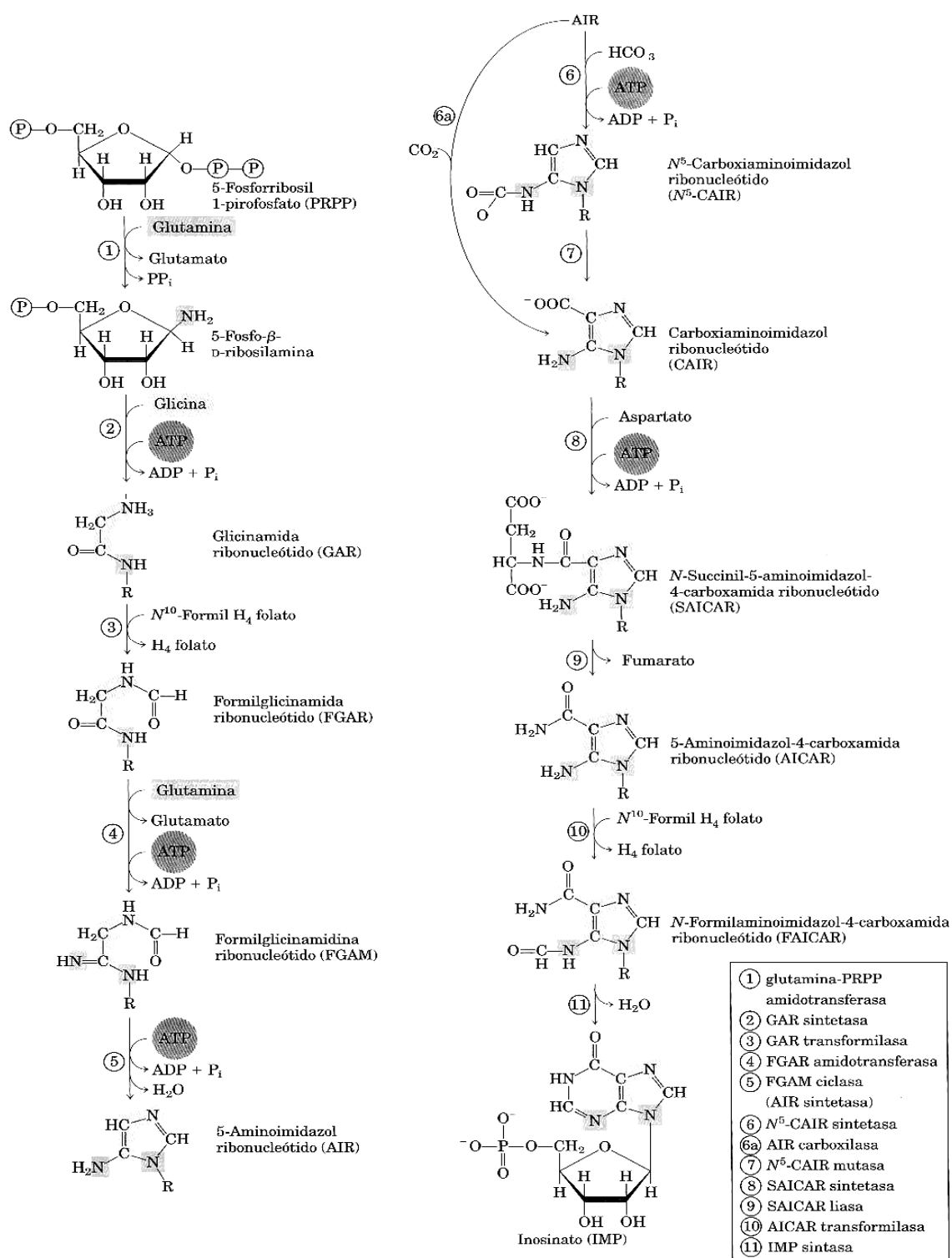
**Biosíntesis de ribonucleótidos púricos**

Se ha podido determinar el origen de cada uno de los carbonos y nitrógenos del núcleo de la purina:



**Figura 6.6.** Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de purina. Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 4<sup>ta</sup> edición.

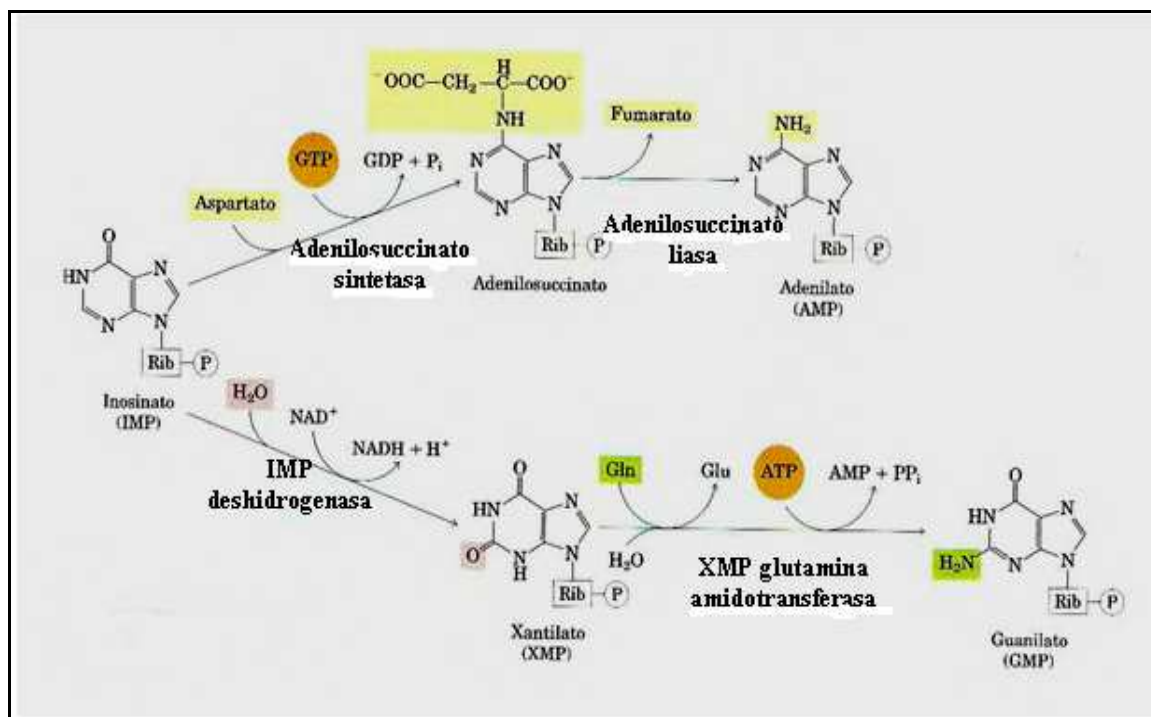
Aunque podría esperarse que se sintetizase el anillo de purina en primer lugar y se uniese después la porción de fosfato de ribosa, la biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con la ribosa-5-fosfato y sobre él, se construye el anillo de purina en etapas sucesivas (figura 6.7).



**Figura 6.7.** Nucleótidos púricos: Síntesis de ácido inosínico (IMP). Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 4<sup>ta</sup> Ed.



De acuerdo al esquema anterior, se observa que se obtiene como producto de la vía el monofosfato de inosina (IMP), a partir del cual derivan los nucleótidos de purina monofosfato de adenosina (AMP) o monofosfato de guanosina (GMP) (figura 6.8).

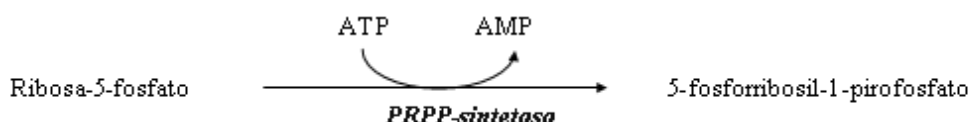


**Fig. 6.8.** Conversión de ácido inosínico en AMP y GMP. Nelson & Cox, “Lehninger. Principios de Bioquímica”, 4ª Ed.

### Regulación de la síntesis de purinas

La síntesis de nucleótidos púricos es regulada por retroalimentación en varios niveles (figura 6.9):

a) Formación de PRPP (5 fosforribosil-1-pirofosfato) por la enzima PRPP-sintetasa.



b) Etapa que va desde PRPP a fosforribosilamina catalizado por la enzima amidofosforribosiltransferasa, que es el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP y GTP actúan como inhibidores. Esta enzima también es inhibida por IDP e ITP.



c) En la vía de bifurcación del IMP para la formación de ATP y GMP. El GTP es utilizado en la síntesis de AMP, mientras que el ATP se utiliza en la síntesis de GMP. Esto lleva que haya un equilibrio en la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y guanina. Cuando se acumula GTP se

activa la enzima adenilosuccinato sintetasa produciéndose más ATP. Cuando se acumula ATP se activa la enzima GMP-sintetasa aumentando los niveles de GTP.

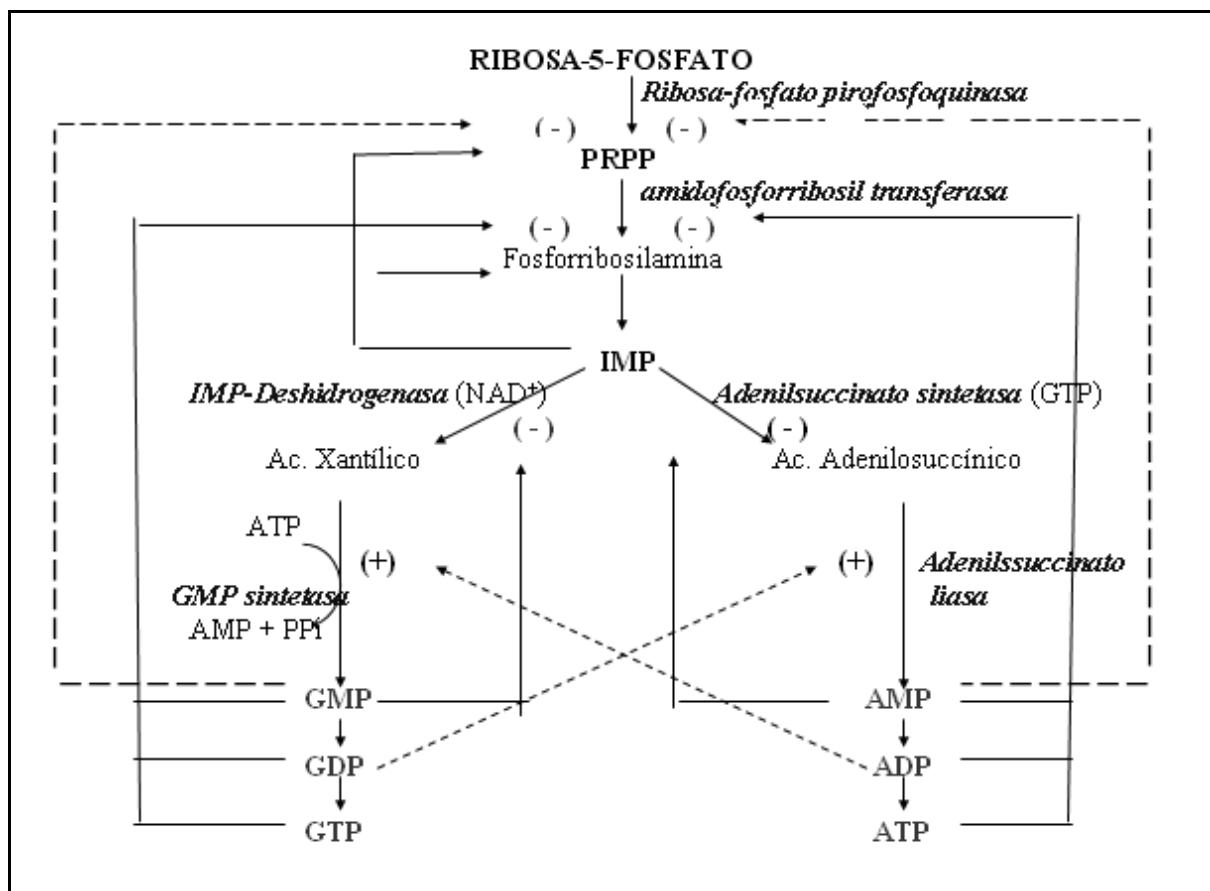
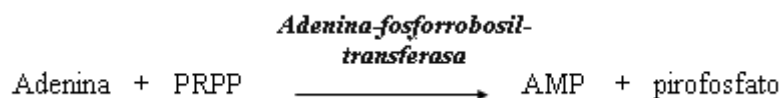


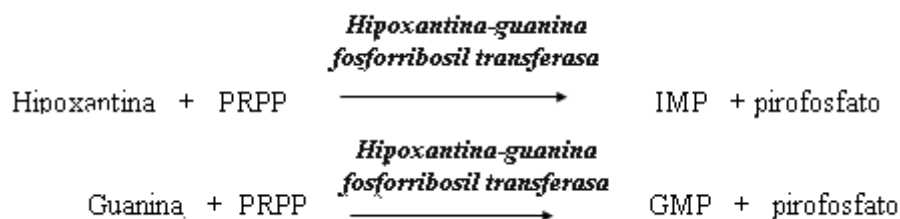
Fig. 6.9: Regulación de la síntesis de nucleótidos de purina.

### Vía de Recuperación de purinas

Las bases púricas libres, ya sean que procedan de la alimentación o del catabolismo de los ácidos nucleicos, pueden ser recicladas en AMP o GMP. El mecanismo principal reside en la reacción de la adenina-fosforribosil-transferasa:



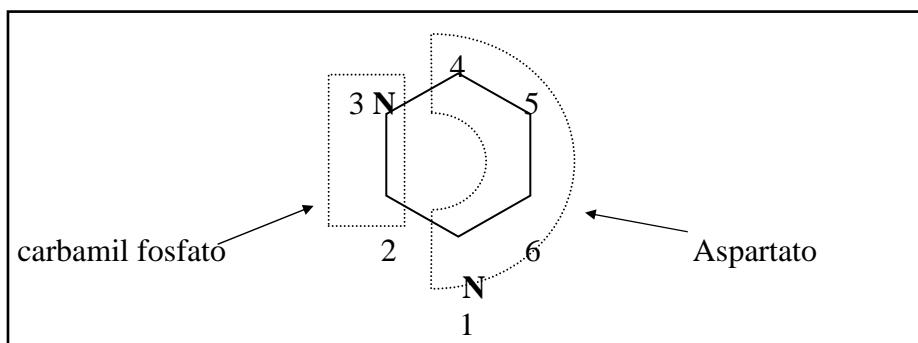
En una reacción semejante, la hipoxantina y la guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes por acción de la hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa.



### Biosíntesis de nucleótidos pirimídicos

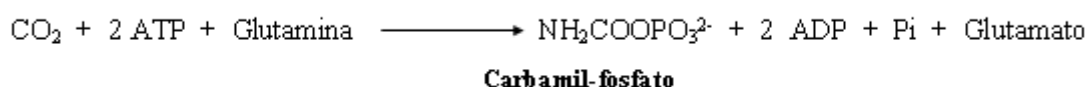
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente de la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa (figura 6.11).

Se necesita carbamil fosfato y aspartato como precursores. La contribución de ambos compuestos en la formación del anillo de pirimidina se puede representar de la siguiente manera:

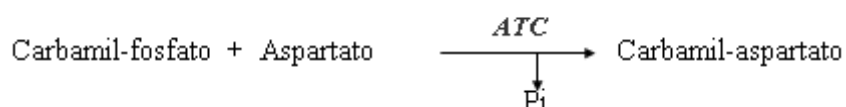


**Fig. 6.10.** Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de pirimidina.

El primer paso de la síntesis de los nucleótidos pirimidínicos, es la formación de carbamilo-fosfato. El grupo amino de este producto, procede de la desaminación de glutamina y la reacción es catalizada por la enzima carbamil fosfato sintetasa:



Una vez formado el carbamil-fosfato, éste se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la aspartato transcarbamilasa (ATC).



Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP.

La biosíntesis de los nucleótidos pirimidínicos está regulada a nivel de la enzima alostérica *aspartato transcarbamilasa*, la cual es inhibida por retroalimentación por el CTP (citidin trifosfato), producto final de la vía.

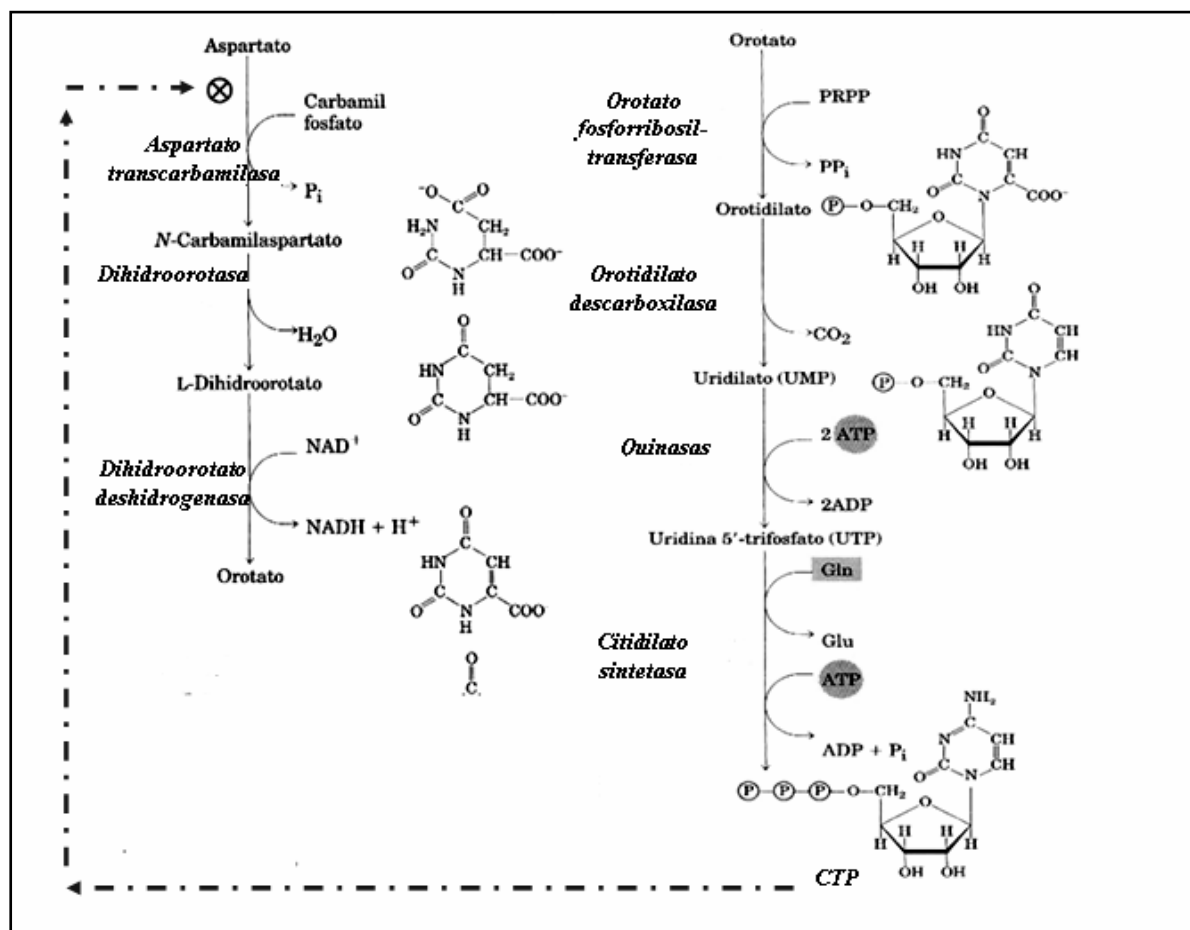
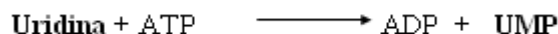


Fig. 6.11. Reacciones involucradas en la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos. Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 4ª Ed.

### Vía de recuperación de bases pirimidínicas

Las células de mamíferos no poseen mecanismos para recuperar nucleótidos a partir de bases libres. Sin embargo, poseen vías de recuperación para convertir nucleósidos (uridina, citidina y timidina) en los nucleótidos correspondientes.



### Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

Normalmente los desoxirribonucleótidos no se sintetizan a partir de la desoxirribosa como elemento de construcción, sino que se forman por reducción directa del carbono 2' de los correspondientes ribonucleótidos (figura 6.12).

Esta vía ha sido muy estudiada en *E. coli*, donde los 4 ribonucleósidos difosfatos (ADP, GDP, UDP, CDP) son directamente reducidos a los correspondientes desoxi-análogos (dADP, dGDP, dUDP, dCDP). La reacción es catalizada por la ribonucleósido difosfato reductasa, enzima que requiere NADPH y tioredoxina como coenzimas.

En el siguiente esquema se muestra la reducción en general de los nucleósidos difosfatos en los correspondientes desoxi-nucleósidos difosfatos.

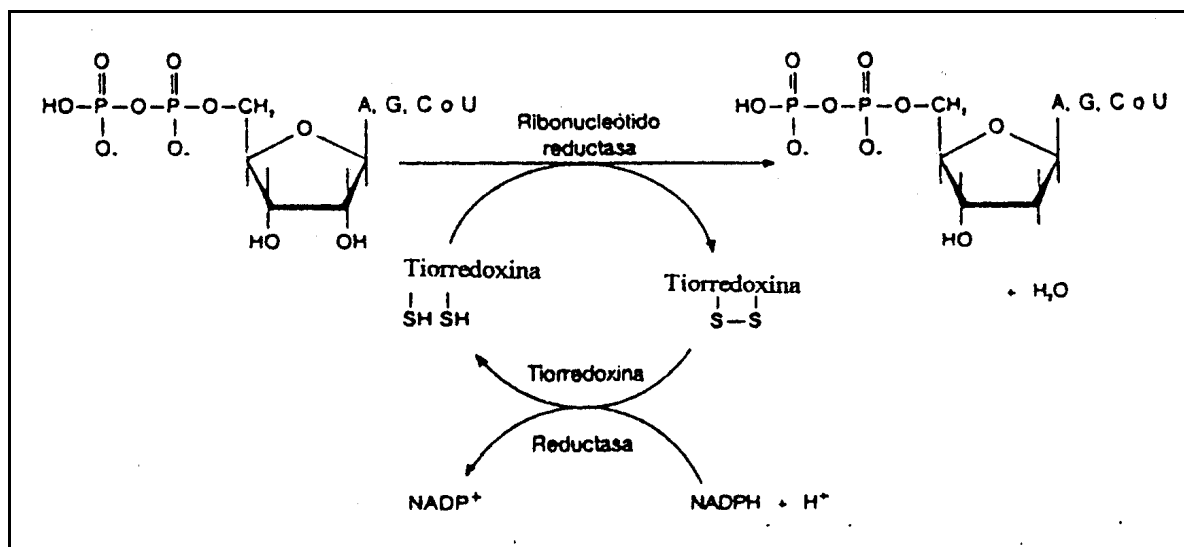


Fig. 6.12. Reacciones involucradas en la biosíntesis de desoxirribonucleótidos.

El control alostérico se realiza a nivel de la enzima *ribonucleótido reductasa* o *ribonucleósido difosfato reductasa*. El dATP actúa como inhibidor general de la síntesis de todos los ribonucleósidos-5'-difosfatos.

### Síntesis de ácido desoxitimidílico

El DNA contiene la base timina en lugar de uracilo. Sin embargo, en la síntesis *de novo* solo se sintetiza el desoxirribonucleótido de uracilo, la base pirimidina del ARN. La síntesis de timina utiliza como precursor es el dUMP a través de una reacción catalizada por la timidilato sintasa. Una unidad monocarbonada es transferida desde el  $N^5, N^{10}$ -metileno tetrahidrofolato hasta el dUMP y luego, reducida para formar un grupo metilo. La reducción tiene lugar a expensas de la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato. La regeneración del tetrahidrofolato se logra por acción de una reductasa con la participación del NADPH (figura 6.13).

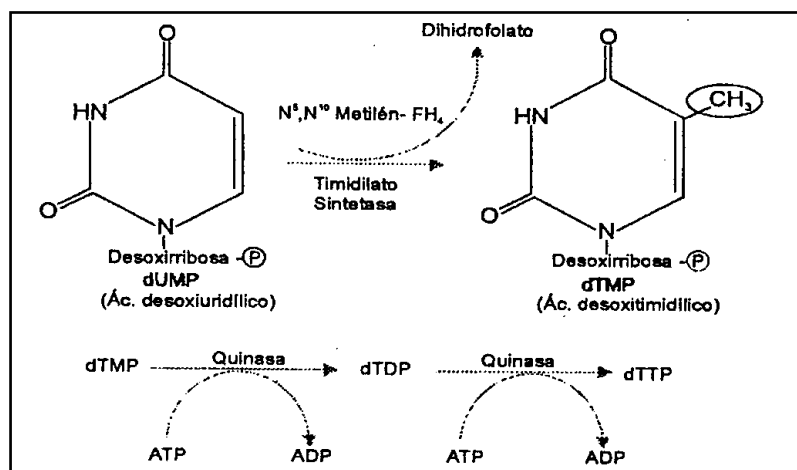


Fig. 6.13. Reacciones involucradas en la biosíntesis de ácido desoxitimidílico (dTMP).

### Catabolismo de purinas

Si las bases libres no son recuperadas y reutilizadas, son degradadas y sus productos finales excretados. Las principales purinas, adenina y guanina, se convierten en xantina, la cual es oxidada a ácido úrico por la acción de la enzima xantina oxidasa.

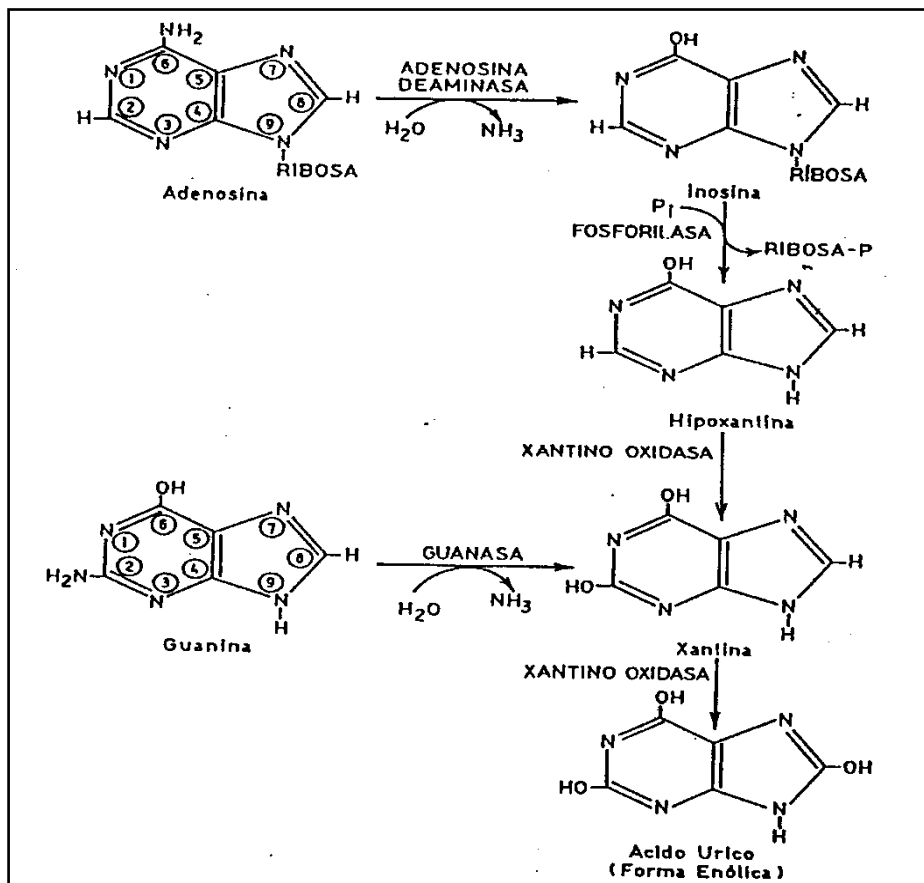


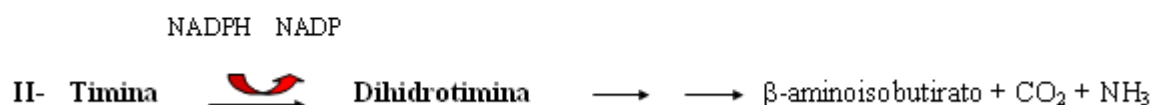
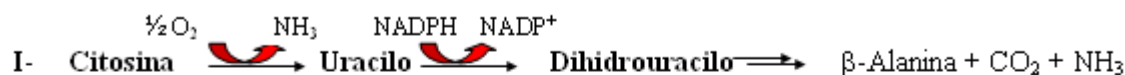
Fig. 6.14. Catabolismo de bases púricas: formación de ácido úrico. Blanco, "Química Biológica", 8° Ed.

### Catabolismo de pirimidinas

El catabolismo de las pirimidinas ocurre principalmente en el hígado y da por resultado la producción de una serie de productos finales altamente solubles. Esto es opuesto a lo que ocurre en el catabolismo de las purinas donde se producen compuestos escasamente solubles: ácido úrico y urato de sodio.

El desprendimiento de CO<sub>2</sub> respiratorio a partir del C2 del núcleo pirimidínico, representa una vía importante para el catabolismo de uracilo, citosina y timina. La β-alanina y el ácido β-aminoisobutírico son los principales productos finales del catabolismo de estas bases.

En pacientes leucémicos y en los sometidos a tratamientos con rayos X se produce un aumento en la eliminación de β-aminoisobutírico, como índice de la degradación exagerada del ADN.



### Origen del tetrahidrofolato y sus transformaciones a derivados transportadores de un carbono

El ácido fólico es un compuesto ampliamente distribuido en las plantas. Su deficiencia en mamíferos provoca una disminución del crecimiento y aparición de diversas formas de anemias. La molécula de ácido fólico está constituida por tres sillares característicos: una pteridina, sustituida, ácido p-aminobenzoico, ácido glutámico.

El efecto bioquímico más sobresaliente de la deficiencia de ácido fólico es el impedimento de la biosíntesis de purinas y de la timina (pirimidina). La forma coenzimática del ácido fólico actúa en la transferencia de ciertos fragmentos monocarbonados utilizados en ésta y otras rutas biosintéticas.

El ácido tetrahidrofólico ( $\text{FH}_4$ ) actúa como transportador intermediario de grupos hidroximetilos, formilo y metilo, en numerosas reacciones enzimáticas. En el siguiente esquema se puede observar las reacciones de reducción y transformación del ácido fólico.

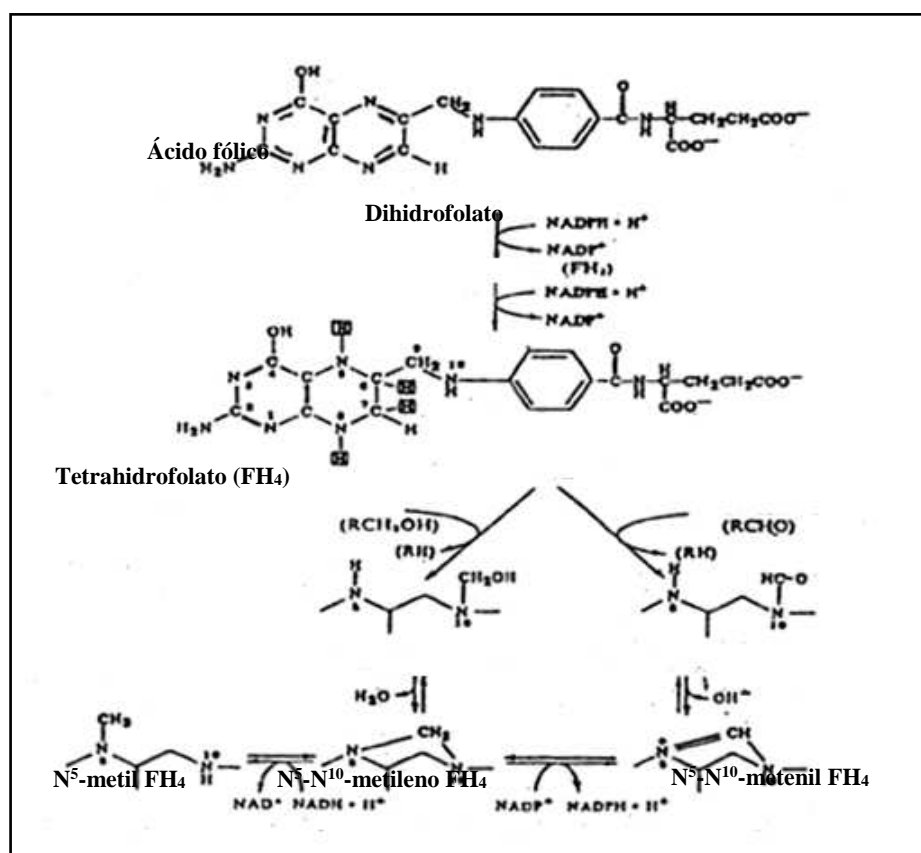


Fig. 6.15. Transformación del ácido fólico para generar las formas metabólicamente activas.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) Indicar la(s) posición(es) en el anillo purínico que se marcará(n) isotópicamente durante la síntesis en las células expuestas a:

a)  $^{15}\text{N}$ -aspartato   b)  $^{14}\text{C}$ -serina (grupo  $\text{OH-CH}_3$  marcado)   c)  $^3\text{H}$ -Oxalacetato (marcado uniformemente)

2) Algunas bacterias necesitan la inclusión de ácido p-aminobenzoico en el medio de cultivo para crecer con normalidad. El crecimiento de tales bacterias está inhibido severamente por la adición de sulfanilamida, una de las primeras drogas con propiedades antibacterianas. Además, en presencia de ella se acumula 5'-fosforribosil-4-carboxamida-5-aminoimidazol en el medio de cultivo. Ambos efectos se invierten por adición del exceso de ácido p-aminobenzoico.

a) ¿Cuál es el papel del Ácido p-aminobenzoico?

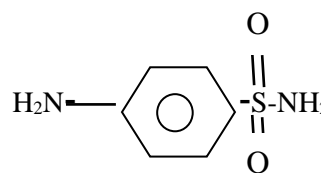
b) ¿Por qué se acumula el compuesto mencionado en presencia de sulfanilamida?

c) ¿Por qué se invierten la inhibición y la acumulación por la adición de exceso de ácido p-aminobenzoico?

Ácido p-aminobenzoico



Sulfanilamida



3) El alopurinol, un inhibidor de la xantinoxidasa, se emplea en el tratamiento de la gota crónica. Explique la base bioquímica de este tratamiento. Los pacientes tratados con alopurinol desarrollan, en ocasiones cálculos de xantina, aunque la incidencia de lesiones renales es mucho menor que la gota sin tratar. Explique esta observación a la luz de las solubilidades siguientes en la orina: Ácido úrico: 0,15 g/l; xantina: 0,05 g/l; hipoxantina: 1,4 g/l.

4) Se marcan los siguientes compuestos:

a) adenosina en el átomo de N del grupo  $\text{NH}_2$ .

b) adenosina en el átomo de C 5.

c) guanina en el átomo de N del grupo  $\text{NH}_2$ .

Mencione donde quedaría la marca en los productos de degradación de purinas en el hombre: ácido úrico y  $\text{NH}_3$ .



---

## GUIA DE ESTUDIO

### Metabolismo de nucleótidos

- En la biosíntesis del fosforribosil pirofosfato ¿qué compuestos se requieren?
- ¿Qué compuestos o intermediarios son comunes en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos?

### Nucleótidos púricos:

- Mencione las dos bases púricas que obtiene a partir del IMP.
- ¿De qué sustancia proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo de purina?
- ¿Cuáles son los compuestos necesarios para su biosíntesis?
- ¿A nivel de qué enzimas está regulada su biosíntesis?
- En la vía de recuperación de bases púricas ¿qué enzima interviene en cada una de las reacciones?
- Degradación de purinas: producción de ácido úrico en el hombre.

### Nucleótidos pirimidínicos:

- ¿Cuáles son las bases pirimidínicas que conoce?
- ¿De qué compuesto proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo pirimidínico?
- Formule la primera reacción de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos.
- ¿Qué enzima interviene en su regulación y cuál es el compuesto que la inhibe?
- Esquematice la síntesis de desoxitimidin monofosfato indicando enzimas y cofactores.
- Degradación de bases pirimidínicas: comparación con el catabolismo de bases púricas.

### Desoxirribonucleótidos:

- En la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos ¿qué átomo de carbono se reduce y cuál es la enzima que cataliza la reacción?
- Mencione los desoxirribonucleótidos que conoce.
- Esquematice la síntesis de desoxitimidinmonofosfato indicando enzima y cofactores.

## BIBLIOGRAFÍA

BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, Bs.As., 2006. Reimpresión año 2007.  
LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4° Edición, 2006. Reimpresión año 2008.

# **TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO**

---

## **CURVA DE CALIBRACIÓN: INFORMACIÓN PARA EL TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°1**

### **OBJETIVO**

Que el alumno sea capaz de:

- Comprender el fundamento de la utilización de curvas de calibración para obtener el valor de concentración de una sustancia en solución.
- Conocer cómo se desarrolló la curva de calibración de azúcares reductores que se utilizará en el trabajo práctico de actividad de Invertasa.

### **INTRODUCCIÓN**

Una curva de calibración es una curva de referencia construida en un sistema de coordenadas a partir de cantidades o concentraciones conocidas de una sustancia que se toma como patrón, estándar, o testigo (eje x), versus un parámetro medible que varía en forma proporcional a esa concentración, por ejemplo: Absorbancia (eje y).

Dicha curva se utiliza para determinar la cantidad de una sustancia desconocida presente en una muestra por interpolación a partir del parámetro medido en la muestra. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de proteínas en solución, a partir de una curva graficada utilizando como patrón, una solución de concentración conocida de albúmina bovina.

En muchas determinaciones se cumple una relación proporcional entre la magnitud o intensidad de color del producto de una reacción y la cantidad del sustrato presente en la muestra, según la ley de Lambert-Beer.

Si se grafica el valor de Absorbancia medido con un espectrofotómetro en función de las concentraciones crecientes de la sustancia patrón se obtiene una recta que permite calcular luego la concentración de dicha sustancia en una muestra determinada.

Los azúcares con propiedades reductoras son aquellos que presentan un grupo cetona o aldehído libre, mediante el cual pueden reaccionar cediendo electrones a otros compuestos. Entre estos azúcares, conocidos en general como “azúcares reductores”, se encuentran glucosa, maltosa, lactosa y galactosa. Si se desea determinar la concentración de azúcar reductor en una muestra desconocida, previamente se debe construir una curva de calibración para azúcares reductores utilizando como patrón Glucosa en concentraciones conocidas y crecientes. El método que emplearemos para determinar azúcares reductores se denomina: método colorimétrico de Nelson y Somogyi. En el trabajo práctico (TP) “Estudio cinético de invertasa de levadura” utilizaremos una curva de calibración.

---

## MÉTODO COLORIMÉTRICO DE NELSON y SOMOGYI

### Fundamento del método

Los azúcares reductores cuando son calentados en presencia del reactivo cuprotartárico en medio alcalino moderado, reducen el cobre del estado cúprico a cuproso, formándose  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Cuando el  $\text{Cu}_2\text{O}$  es tratado con ácido arsenomolibdico, éste se reduce y forma óxidos de molibdeno de menor valencia, color verde azulado, cuya intensidad de absorción es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes.

### Procedimiento general

Sobre una alícuota de solución de glucosa utilizada como patrón (previamente desproteinizadas y filtradas) adicionar el reactivo cuprotartárico, de alcalinidad moderada y mezclar rotando suavemente. Calentar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar bajo agua corriente sin agitación violenta para evitar la reoxidación del  $\text{Cu}_2\text{O}$  por el oxígeno del aire. En frío agregar el reactivo arsenomolibdico. Leer en espectrofotómetro a 620 nm entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.

### Reactivos (Curva de calibración)

Glucosa	0.003 M
NaOH	0.6 N
$\text{SO}_4\text{Zn}$	0.6 N

La solución de glucosa que se utiliza como patrón (en cantidades conocidas y crecientes) para realizar la curva de calibración, es tratada con agentes precipitantes de proteínas ( $\text{NaOH}$  y  $\text{ZnSO}_4$ ) y luego filtrada. Estos pasos se realizan para igualar las condiciones de reacción con aquellas que se utilizarán en el TP para la determinación de la actividad de invertasa.

### Reactivo Cuprotartárico:

Solución A:	Sulfato de cobre al 2 %
	Sulfato de sodio anhidro al 12 %.
Solución B:	Carbonato de sodio anhidro a 3 %
	Bicarbonato de sodio al 2%
	Tartrato de sodio y potasio al 1.5 %
	Sulfato de sodio anhidro al 12 %

En el momento de usar, mezclar 1 volumen de A y 4 volúmenes de B.

Reactivo Arsenomolibdico:

Solución A: Molibdato de amonio. 25 g  
 Ácido sulfúrico conc. 21 ml  
 H<sub>2</sub>O destilada. 450 ml

Solución B: Arseniato disódico, 7H<sub>2</sub>O. 3 g  
 H<sub>2</sub>O destilada. 25 ml

Mezclar y mantener a 37 °C durante 24 h. Guardar en frasco color caramelo.

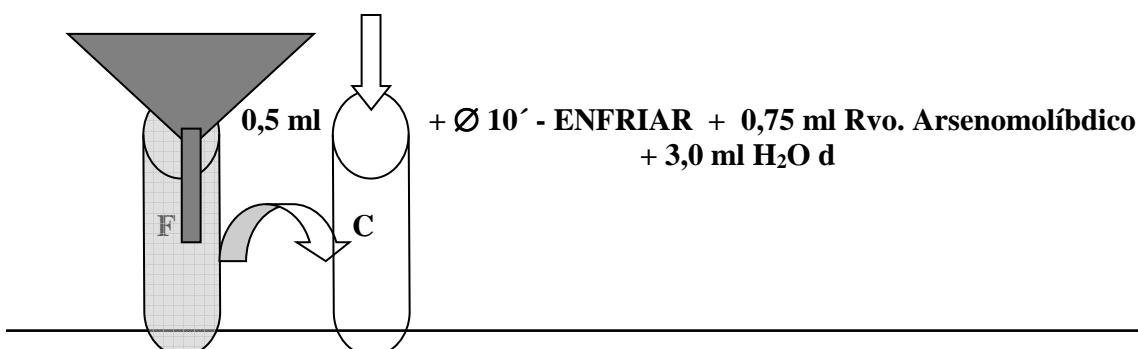
**TÉCNICA**

Preparar la siguiente serie de tubos y agregar los reactivos que se indican a continuación:

Tubos N°	1 (Bco.)	2	3	4	5	6
NaOH 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glucosa 0,003 M (ml)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Zn SO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O d. (ml)	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0
<b>Mezclar bien y filtrar</b>						
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b>						
Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color						
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Muestra (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<b>Mezclar suavemente</b>						
<b>Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.</b>						
<b>Enfriar con agua corriente y agregar en ml:</b>						
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H <sub>2</sub> O d.	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Mezclar enérgicamente</b>						
<b>Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm. Utilizar como blanco el tubo N° 1.</b>						

Esquema resumido de la técnica desde la operación de filtrado:**Tomar 0,5 ml de cada filtrado**

Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color:

**0,75 ml Rvo. Cuprotartárico**

## RESULTADOS

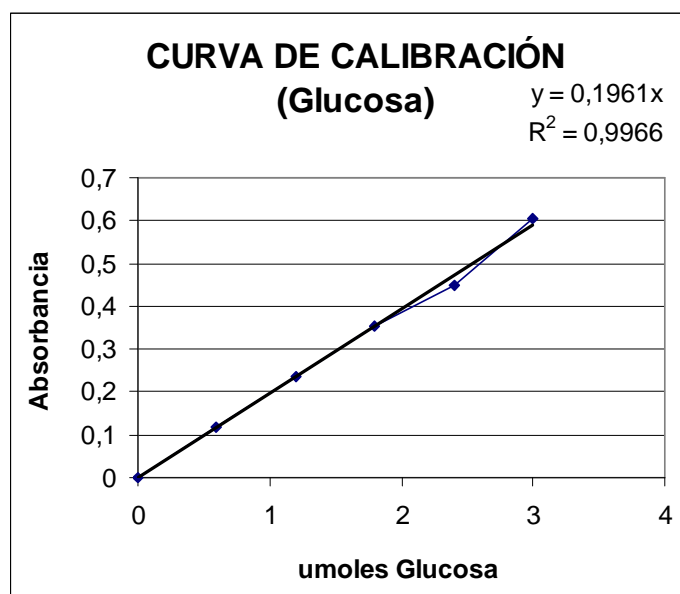
Con los datos obtenidos se grafica **absorbancia** en relación con la **concentración** de glucosa, obteniéndose una recta que pasa por el origen.

Cuando por el efecto de la invertasa sobre sacarosa, se produce una cierta cantidad desconocida de azúcar reductor, ésta puede calcularse por medio de la curva de calibración.

Teniendo en cuenta que las concentraciones finales de glucosa son las siguientes:

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Glucosa (μmoles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
ABSORBANCIA	0	0,117	0,236	0,353	0,448	0,606

Graficamos las lecturas de densidades ópticas versus los μmoles de glucosa.



## TRABAJO PRÁCTICO N° 1 ESTUDIO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### OBJETIVOS

Que el alumno sea capaz de:

- Determinar la actividad enzimática de la invertasa.
- Comprender como influyen sobre la actividad enzimática las variaciones de pH y de la temperatura.
- Utilizar la curva de calibración para el cálculo de resultados de velocidad de reacción.
- Realizar e interpretar las gráficas de velocidad inicial en función del pH y en función de la temperatura.

### INTRODUCCIÓN

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. Para este objeto es necesario saber:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. Si la enzima precisa de la adición de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. Su dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores; es decir el valor de  $K_m$  para el sustrato y para el cofactor.
4. Su pH óptimo.
5. Una zona de temperatura en que sea estable y muestre actividad elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o aparición de los productos.

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el total presente de la mezcla.

Para indicar la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones. Un modo habitual de indicar la actividad de una enzima es en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad de** cualquier **enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ( $1\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$ ) de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, los cuales deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Ellos son: **concentración de enzima**,

**concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.**

### **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE INVERTASA DE LEVADURA INFLUENCIA DE pH Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO**

La *invertasa* es una enzima que se clasifica en la clase 3 de las hidrolasas y dentro de éstas en la subclase 3.2 de las glicosidasas, siendo específicamente una  $\beta$ -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26). El sustrato principal de esta enzima es la sacarosa (disacárido no reductor) y la reacción que cataliza es la siguiente:



La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante el método colorimétrico de Nelson-Somogyi.

#### **Obtención de la Enzima**

La invertasa de la levadura se obtiene por lisis celular y suspensión acuosa, quedando en solución. El extracto centrifugado se utiliza sin más purificación. En un mortero se disgregan juntos 5 g de levadura, 0.5 g de fosfato diamónico y 2 ml de tolueno, se mezclan bien homogeneizando la pasta perfectamente. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se agregan, en pequeñas porciones, 90 ml de agua destilada a 35 °C, procurando deshacer y suspender bien todo el material con el pilón. Dejar luego en reposo durante 15 min., con agitación ocasional. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante que contiene el extracto enzimático.

#### **Detenimiento de la actividad enzimática: Desproteínizado**

Para detener la actividad enzimática, una vez cumplido el tiempo de reacción, se separa la enzima por precipitación de todas las proteínas presentes en la muestra, utilizando reactivos de distinta naturaleza.

En este caso la desproteínización se logra con el agregado de NaOH y ZnSO<sub>4</sub>, el Zn(OH)<sub>2</sub> formado precipita y arrastra a la enzima. Estas muestras se filtran y sobre una alícuota del filtrado se realiza la reacción de color.

#### **A) INFLUENCIA DE PH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA**

La actividad de la invertasa, como la de todas las enzimas, depende de la composición iónica del medio y muy especialmente del pH. Se estudiará la variación de esa actividad en medios de diferente pH.



Se mantiene constante toda otra variable que afecte la actividad enzimática.

**Reactivos:**

- Buffer citrato pH = 3,0 - 4,5 y 6,0.
- Citrato trisódico 0,1 M pH = 8,6
- Sacarosa 0,5 M
- NaOH 0,6 N
- Zn SO<sub>4</sub> 0,6 N
- Reactivo Cuprotartárico.
- Reactivo Arsenomolibdico.

**Extracto enzimático.** El extracto es obtenido siguiendo la técnica anteriormente descrita, y **debe diluirse en una relación 1/30.**

**TÉCNICA:** Ordenar en gradillas diferentes las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	<b>R-1</b>	<b>R-2</b>	<b>R-3</b>	<b>R-4</b>	
Tubos de Desproteínizado	<b>D-1</b>	<b>D-2</b>	<b>D-3</b>	<b>D-4</b>	<b>D-5 (Bco.)</b>
Tubos de filtrado	<b>F-1</b>	<b>F-2</b>	<b>F-3</b>	<b>F-4</b>	<b>F-5</b>
Tubos de colorimetría	<b>C-1</b>	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C-4</b>	<b>C-5</b>

Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos:

Tubo N°	<b>R-1</b>	<b>R-2</b>	<b>R-3</b>	<b>R-4</b>
<b>pH aproximado</b>	<b>3,0</b>	<b>4,5</b>	<b>6,0</b>	<b>8,6</b>
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	-
Citrato trisódico (ml)	-	-	-	5,0
Sacarosa 0.5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H <sub>2</sub> O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente <b>Adicionar a c/tubo con pipeta distinta.</b> Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de <b>10 minutos</b> <b>Iniciar</b> el protocolo de desproteínizado, en el tiempo de espera.				

b) Colocar en los **tubos de desproteínizado** los siguientes reactivos:

Tubos de desproteínizado	<b>D-1</b>	<b>D-2</b>	<b>D-3</b>	<b>D-4</b>	<b>D-5 (Bco.)</b>
Na(OH) 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Al cabo del tiempo de reacción (10'),</b> extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteínizado D-1, D-2, D-3 y D-4 respectivamente, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	No

					contiene
ZnSO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Completar a volumen de 10 ml con H <sub>2</sub> O d.	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
<b>Filtrar</b> Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla.					
Tubos de Filtrado	<b>F-1</b>	<b>F-2</b>	<b>F-3</b>	<b>F-4</b>	<b>F-5</b>
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b> Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color.					
Tubos de colorimetría	<b>C-1</b>	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C-4</b>	<b>C-5</b>
Filtrado (ml)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Rvo. cuprotartárico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
<b>Mezclar</b> suavemente <b>Colocar en baño maría hirviendo</b> durante 10 min. <b>Enfriar</b> con agua corriente y agregar:					
Rvo. arsenomolibdico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
H <sub>2</sub> O d.	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
<b>Mezclar</b> <b>Leer Absorbancia</b> en fotocolorímetro con filtro 62 o en espectrofotómetro a 620 nm <b>Utilizar</b> como blanco el tubo N° 5.					

**RESULTADOS:** Con los datos obtenidos completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
pH del medio	3,0	4,5	6,0	7,0
Absorbancia				
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )				

1. **Graficar** sacarosa hidrolizada en función del pH del medio.
2. **Graficar** velocidad inicial de reacción en función del pH.

## B) DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE REACCION ENZIMÁTICA CON LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

### Determinación de la constante de Michaelis - Menten (Km)

Para obtener Km se miden las velocidades de reacción con cantidades constantes de enzima y concentraciones crecientes de sustrato, en un medio buffer acético - acetato de sodio a pH 4,77.

#### Reactivos

- Buffer acético - acetato pH 4,77
- Sacarosa 0,5 M
- Sacarosa 0,05 M

- NaOH 0,6 N
- ZnSO<sub>4</sub> 0,6 N
- Reactivo cuprotartárico
- Reactivo arsenomolibdico
- Extracto enzimático

### Actividades a desarrollar

Para la realización de la técnica, ordenar en gradillas las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	<b>R-1</b>	<b>R-2</b>	<b>R-3</b>	<b>R-4 (Bco.)</b>
Tubos de desproteínizado	<b>D-1</b>	<b>D-2</b>	<b>D-3</b>	<b>D-4</b>
Tubos de filtrado	<b>F-1</b>	<b>F-2</b>	<b>F-3</b>	<b>F-4</b>
Tubos de colorimetría	<b>C-1</b>	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C-4</b>

El extracto enzimático a usar debe ser diluido 1/30. Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos

Tubo N°	<b>R-1</b>	<b>R-2</b>	<b>R-3</b>
Buffer 0,1M, pH 4,77 (ml)	2,0	2,0	2,0
Sacarosa 0,5 M (ml)	-	-	2,0
Sacarosa 0,05 M (ml)	2,0	4,0	--
H <sub>2</sub> O d. (ml)	5,0	3,0	5,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente.			
<b>Adicionar a c/tubo con pipeta distinta.</b> Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:			
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0
Mezclar			
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido			
Comenzar a contar el tiempo de <b>10 minutos</b> <b>Iniciar</b> el protocolo de desproteínizado, en el tiempo de espera.			

b) Colocar en los **tubos de desproteínizado** los siguientes reactivos:

Tubos de desproteínizado	<b>D-1</b>	<b>D-2</b>	<b>D-3</b>	<b>D-4(Bco.)</b>
Na(OH) 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Al cabo del tiempo de reacción (10'),</b> extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteínizado D-1, D-2 y D-3 respectivamente, como se indica a continuación:				
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	No contiene
ZnSO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Completar a volumen de 10 ml con H <sub>2</sub> O d.	7,0	7,0	7,0	7,0

<b>Filtrar</b>				
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla				
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b> Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color.				
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4
Filtrado (ml)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Rvo. Cuprotartárico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
<b>Mezclar</b> suavemente <b>Colocar en baño maría hirviente</b> durante 10 min. <b>Enfriar</b> con agua corriente y agregar:				
Rvo. Arsenomolibdico	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml
H <sub>2</sub> O d.	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
<b>Mezclar</b> <b>Leer Absorbancia</b> en fotocolorímetro con filtro 62 o en espectrofotómetro a 620 nm <b>Utilizar</b> como blanco el tubo N° 4.				

**RESULTADOS:** Con los datos obtenidos completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
Concentración de sustrato	0,01 M	0,02 M	0,1 M	0 (blanco)
Absorbancia				
Absorbancia corregida				--
μmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				--
Velocidad inicial (s h ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )				--

**Formas gráficas para determinar Km:**

1. Graficar los valores de actividad enzimática (V) en función de la concentración de sustrato ([S]).  
Estimar el valor aproximado de Km a partir de la gráfica.
2. Utilizando los valores recíprocos 1/V y 1/[S], trazar una recta según la ecuación de Lineweaver-Burk.
3. Determinar el valor de Km en la recta anterior

---

## **TRABAJO PRÁCTICO N° 2**

### **TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL.**

### **FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

#### **OBJETIVOS**

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Diferenciar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico mitocondrial en una muestra de tejido animal.
- Comprobar empíricamente la inhibición competitiva de la enzima succinato deshidrogenasa.

#### **INTRODUCCIÓN**

En este trabajo de laboratorio se estudiará el funcionamiento de la cadena respiratoria, utilizando succinato como sustrato y azul de metileno como indicador. También en esta experiencia se verificará el efecto inhibitorio del malonato sobre la cadena respiratoria.

Existen algunas sustancias orgánicas no fisiológicas como el azul de metileno, que pueden intercalarse en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, aceptando los electrones provenientes de la oxidación del sustrato. Estas sustancias son de enorme utilidad para estudiar la organización de la cadena respiratoria.

El azul de metileno es una sustancia auto-oxidante, es decir, puede ser oxidada directamente por el oxígeno molecular adquiriendo un color azul intenso. Al reducirse por captación de hidrógeno, el azul de metileno se decolora.

Aprovechando esta característica del azul de metileno, cuyo potencial de óxido reducción es + 0,01, puede estudiarse la oxidación del ácido succínico a fumárico (potencial redox = - 0,030), reemplazando a la CoQ como aceptor de electrones por el azul de metileno. La velocidad de decoloración del azul de metileno proporciona una indicación de la actividad de la succínico deshidrogenasa (que utiliza FAD como grupo prostético) que cataliza la reacción. La acción de inhibidores sobre esta enzima puede estudiarse comparando el tiempo de decoloración del azul de metileno con el tiempo de decoloración normal, en ausencia del inhibidor.

#### **Preparación del extracto enzimático**

Se utiliza corazón fresco vacuno, el que se corta en trozos pequeños, se pesan 16 gr y se homogeneizan junto con 40 ml de buffer fosfato pH 7,4 en una licuadora fría. Este preparado se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m. El sobrenadante contiene entre otras, las enzimas de la cadena

de transporte electrónico. El sobrenadante de la centrifugación a bajas revoluciones se puede centrifugar en ultracentrífuga durante 30 min. a 10.500 r.p.m. El precipitado se retoma con 5 ml de buffer y se homogeneiza. Este homogenato, está enriquecido en mitocondrias, y se puede utilizar como extracto enzimático).

En este trabajo práctico, se demostrará el transporte electrónico mitocondrial a través de la captación de hidrógenos por el azul de metileno y se realizará la inhibición competitiva de la succinato deshidrogenasa por malonato, cuya estructura molecular es muy semejante a la del sustrato de la enzima.

#### Reactivos:

- Succinato de sodio 0,1 M
- Azul de metileno 0,001 M (diluido 1/100)
- Buffer fosfato pH 7,4
- Malonato de sodio 0,05 M
- Vaselina líquida

Extracto enzimático

#### Técnica:

TUBO	1	2	3	4	5
Succinato de sodio (ml)	0,9	-----	0,9	0,9	0,9
Buffer pH 7,4 (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Malonato de sodio (ml)	----	----	0,2	----	----
Agua destilada (ml)	2,1	2,0	0,9	1,1	1,1
Azul de metileno (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Succinato deshidrogenasa (extracto enzimático)	----	1,0	1,0	1,0	1,0

#### **\*ANTES DE AGREGAR LA ENZIMA LEER LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES**

**Tubo N° 2:** agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión y colocar suavemente 1,0 ml de vaselina líquida. Tapar enseguida, con un tapón de goma y dejarlo en reposo. Proceder de la misma forma con el resto de los tubos.

**Tubo N° 5:** agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión. **NO se le agrega vaselina ni se lo tapa.** Al decolorarse el tubo N° 5, agítelo y observe.

Después de decolorarse el **tubo N° 4** y habiéndose constatado la inhibición en el **tubo N° 3**, agregar a éste, 0,9 ml. de succinato de sodio para comprobar la inhibición competitiva con **malonato de sodio**.

#### Resultados

- Registre el tiempo que demora en decolorarse el azul de metileno en cada tubo.

- Teniendo en cuenta la decoloración o no del azul de metileno en cada uno de los tubos, fundamente los resultados obtenidos.

---

**TRABAJO PRÁCTICO N° 3**  
**METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO:**  
**Vía Glicolítica. Demostración de la fermentación en levaduras**

**OBJETIVOS**

Que el alumno pueda:

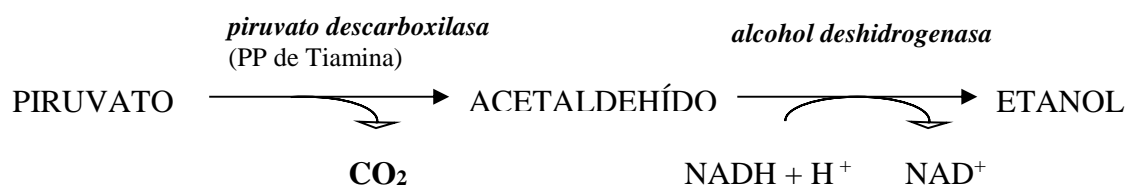
- Adquirir destreza en el manejo de pipetas automáticas.
- Comprobar experimentalmente el mecanismo de adaptación del metabolismo de glucosa a las condiciones ambientales.

**INTRODUCCIÓN**

Las células animales, los microorganismos y las plantas utilizan como principal fuente de energía los hidratos de carbono. A partir de su degradación obtienen energía en forma de ATP y otros compuestos de alto contenido energético los cuales son utilizados en los procesos de biosíntesis.

Los intermediarios metabólicos obtenidos de la degradación de la glucosa dependen de las condiciones ambientales en que se encuentran las células, si la concentración de oxígeno es suficiente generalmente se degradan totalmente hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno es escasa, la célula recurre a la fermentación. A través de este proceso se obtienen diferentes tipos de intermediarios metabólicos según el tipo de célula y de los sustratos disponibles: Por ejemplo: una célula muscular y ciertos tipos de lactobacilos acumulan ácido láctico, ciertas levaduras producen alcohol, etc.

En la industria se aprovecha la capacidad de muchos microorganismos de acumular metabolitos que son de gran utilidad. Por ejemplo, en la fabricación de pan y de vino se utilizan cepas diferentes de la levadura *Saccharomyces cereviceae*.



**EFEECTO PASTEUR**

Cultivando levaduras, Louis Pasteur observó que el consumo de glucosa en un medio anaeróbico era considerablemente mayor que el observado en cultivos con abundante provisión de oxígeno. Esto se llamó “Efecto Pasteur”, el cual es un mecanismo de adaptación de las células, donde la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos metabólicos de la misma.

El fundamento bioquímico del “Efecto Pasteur” es el siguiente:



El rendimiento de ATP de la glucólisis en condiciones anaeróbicas es de 2 ATP, por molécula de glucosa, que es mucho menor que el de la oxidación completa de glucosa a CO<sub>2</sub> en condiciones aeróbicas que corresponden a 36 o 38 ATP por molécula de glucosa. Para conseguir la misma cantidad de ATP se ha de consumir 18 veces más glucosa en condiciones anaeróbicas.

En el Trabajo práctico se estudiará el “Efecto Pasteur”, comparando el consumo de glucosa entre un cultivo de levaduras *S. cereviceae* mantenidos en condiciones aeróbicas y otro en condiciones anaeróbicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Medio de cultivo:** Extracto de Levadura 0,01 g; glucosa 1,00 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0,1 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04 g; MgCl<sub>2</sub> 0,04 g.; FeSO<sub>4</sub> 0,01 g.; H<sub>2</sub>O d.c.s.p. 200 ml.; pH: 4,5-5,00.

Inocular con 10 ml de una suspensión de levaduras (1g en 10 ml de H<sub>2</sub>O) en erlenmeyers de 250 ml y 125 ml conteniendo 100 ml del medio de cultivo cada uno. Incubar durante 24 h, el erlenmeyer de 250 ml en condiciones **aeróbicas** en agitador a 100 rpm, al erlenmeyer de 150 ml agregar una capa de vaselina para crear condiciones **anaeróbicas** y mantener en reposo.

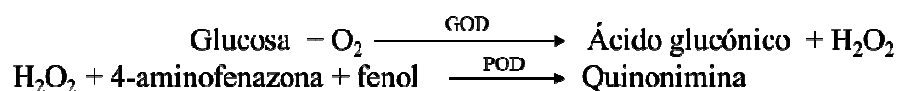
## DETERMINACIONES A REALIZAR

Para proceder a la determinación de los metabolitos correspondientes se tomará una alícuota de 5 ml. de cultivo, si es necesario se hace una centrifugación previa para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

### a) DETERMINACIÓN DE GLUCOSA:

Se determinará cuantitativamente al comenzar y al finalizar la experiencia con el objeto de ver el consumo de la glucosa por la célula microbiana.

**Fundamento del método:** La glucosa es oxidada enzimáticamente por acción de la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este último producto, en presencia de una peroxidasa (POD) ocurre la unión oxidativa del fenol con 4-aminofenazona, dando lugar a la formación de un cromógeno rojo (“quinonimina”), con un máximo de absorbancia a 505 nm. El mencionado fundamento puede resumirse en las siguientes reacciones acopladas:



La quinonimina es un compuesto de color rojo que tiene un pico de absorbancia a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

## Reactivos

Standard: solución de glucosa 1g/l

GOD/POD: solución de glucosa oxidasa (1000U/l) y peroxidasa (120 U/l)

4-AF: solución de 4-aminofenazona (25 mmol/l) en buffer tris.

Fenol: solución de fenol (55 mmol/l)

## TÉCNICA

Preparar 5 tubos de hemólisis rotulados de la siguiente forma:

Tubo 1- Medio inicial; Tubo 2- Anaeróbico; Tubo 3- Aeróbico; Blanco y Testigo.

TUBOS	BLANCO	TESTIGO	1 inicial	2 anaeróbico	3 aeróbico
Muestra (μl)	----	-----	10 (*)	10	10
Testigo (μl)	----	10	-----	-----	-----
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1	1	1

Mezclar e incubar 10 min a 37 °C. Leer a 505nm.

(\*) En el medio inicial, la concentración de glucosa es superior al rango lineal de la reacción de color, por ello es que se realiza una dilución de la muestra a la mitad y se toman los 10μl de esta dilución. En el cálculo final multiplicar por dos el resultado obtenido para este tubo.

### Cálculos:

Determinar la concentración de glucosa de cada tubo muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

**Glucosa g/l:** Absorbancia de la muestra corregida x f

$$f = \frac{1,00\text{g/l}}{\text{Abs. Testigo corregida}}$$

## b) DETERMINACIÓN DE ALCOHOL: MÉTODO DE MICRODIFUSIÓN

**Fundamento:** El etanol reacciona con una solución de dicromato de potasio en medio sulfúrico causando la oxidación del alcohol a ácido acético y la reducción del ion dicromato (color naranja) a crómico (color azul).



	<b>Medio de cultivo inicial</b>	<b>Sobrenadante de cultivo en aerobiosis</b>	<b>Sobrenadante de cultivo en anaerobiosis</b>
<b>Concentración de Glucosa remanente</b>			
<b>Presencia de Etanol</b>			

---

## TRABAJO PRÁCTICO N° 4

### DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

#### OBJETIVOS

- Analizar el metabolismo de hidratos de carbono y ciclo de Krebs mediante la determinación del ácido cítrico generado por un cultivo de *Aspergillus Níger*.
- Demostrar la utilización de ácido cítrico en la industria alimentaria, determinando su presencia en distintos alimentos manufacturados.

#### INTRODUCCIÓN

El citrato es una sustancia natural presente en plantas. Industrialmente es obtenido principalmente a través de procesos que precisan de la intervención de microorganismos productores de ácidos orgánicos dentro de los que se destacan los hongos filamentosos, especialmente de los géneros *Aspergillus Níger* y *Penicillium*.

Alrededor del 60 % del ácido cítrico producido es utilizado en la industria alimenticia, un 10 % en la industria farmacéutica y un 25 % en la industria química. En la industria alimentaria se adiciona como conservantes y para realzar el sabor. En la industria química como agente anti-espuma, como suavizante y para el tratamiento de textiles, además por ser fácilmente biodegradable también es utilizado en detergentes para reemplazar a los polifosfatos, cuyo uso ha sido prohibido en muchos lugares.

#### Procedimiento general y fundamento bioquímico de la producción de ácido cítrico por la cepa de *A. niger* NRRL-1419

Para determinar la producción de ácido cítrico en cultivo se utilizará la cepa mutante de *Aspergillus niger* NRRL -1419. Esta cepa es seleccionada específicamente por poseer la característica de producir la acumulación de grandes cantidades de ácido cítrico, cuando es cultivada en un medio con alto contenido de sacarosa.

El ciclo de Krebs cumple la función de generar energía en forma de ATP o equivalentes de reducción, acoplándose a la fosforilación oxidativa. En condiciones ambientales que promueven el desarrollo celular, el ciclo funciona en estado estacionario, es decir, que los intermediarios que lo constituyen se mantienen en niveles bajos, sin acumulación de alguno de ellos en particular. Dicho estado estacionario es conseguido mediante una regulación precisa de las enzimas presentes en las rutas metabólicas que alimentan el ciclo (recordar las vías anapleróticas). Así, resulta evidente que la producción de ácido cítrico por parte de un microorganismo requiere un funcionamiento defectuoso del ciclo de Krebs, lo cual permite la acumulación de este producto y su liberación al exterior celular para ser recuperado en el medio de cultivo.

El catabolismo de hexosas, en condiciones aeróbicas, ocurre fundamentalmente mediante la vía glicolítica, con una pequeña contribución de la vía de las pentosas fosfato. Muchas de las cepas

---

utilizadas en la industria, como el caso de la cepa NRRL-1419 de *A. niger*, poseen mutaciones para los genes que codifican las enzimas citrato sintasa (que generan una variable enzimática que posee una actividad 7-10 veces mayor, comparada con la enzima de una cepa no productora de citrato) y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual no se expresa. Esto último, favorece el proceso de producción de ácido cítrico. Sin embargo, se debe considerar que también es necesario bloquear los equilibrios que existen entre citrato e isocitrato, a través de cis-aconitato. Para bloquear los mencionados equilibrios, se reduce al mínimo la actividad de la aconitasa, mediante la ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  en el cultivo.

Ante la ruptura del ciclo, se interrumpe la síntesis del resto de los intermediarios, los cuales son repuestos por las reacciones anapleróticas. De estas reacciones, la más importante es la catalizada por la piruvato carboxilasa.

El citrato así acumulado, sale al citosol utilizando la lanzadera de citrato. Una vez en este compartimento celular, el citrato produciría una inhibición de la fosfofructoquinasa, principal punto de regulación de la vía glicolítica. Por lo tanto, para asegurar un continuo catabolismo de hexosas, es necesario insensibilizar a la fosfofructoquinasa de la acción moduladora del citrato. La sensibilidad de esta enzima al citrato, se anula en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , en concentraciones superiores a las fisiológicamente usuales. La alta concentración de este ion se consigue por ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio de cultivo. Esta deficiencia, induce la síntesis de una proteasa, que provoca un aumento en el recambio de proteínas y una elevación del nivel de  $\text{NH}_4^+$  en la célula.

### **Inoculación de un medio de cultivo específico con *Aspergillus niger* NRRL-1419**

En un erlenmeyer de 250ml, conteniendo 100 ml de un medio específico estéril (contiene sacarosa como fuente de carbonos, extracto de levadura que aporta nitrógeno, vitaminas y determinados minerales como  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cu}^{+2}$ ), se siembran 10 ml de un inóculo de *A. niger* y se coloca en condiciones aeróbicas, a 100 rpm, a 28° C durante 5 días.

### **Obtención de las muestras para la determinación de ácido cítrico**

Se determinará la concentración de ácido cítrico en dos tipos de muestras diferentes: una muestra de cultivo de *A. niger* (M1) y muestras provenientes de productos alimenticios manufacturados (M2 y M3):

- Jugo de manzana (marca comercial). En estas bebidas el ácido cítrico se utiliza como acidulante y realzante del sabor.
- Vino blanco de mesa. En esta muestra no se emplea como agregado especial en la industria vitivinícola, es posible encontrarlo en los vinos como un producto secundario a la fermentación alcohólica y en muy baja concentración.

Para la obtención de M1 se tomará una alícuota de 5 ml de medio de cultivo de *A. Níger* y se centrifugará a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. A partir del sobrenadante de esta alícuota, se determinará la concentración de ácido cítrico.

En el caso de M2, la muestra de jugo de manzana será diluida 1:5 en agua destilada, previo a la determinación de ácido cítrico. Finalmente, una porción de M3 será utilizada sin diluir para determinar la concentración de ácido cítrico.

## MÉTODO UV PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EN ALIMENTOS Y OTROS MATERIALES (Roche)

### Fundamento

Este método se basa en la reacción de conversión del ácido cítrico (citrato) en oxalacetato, gracias a la reacción catalizada por la enzima citrato liasa (CL).



En presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), el oxalacetato y su producto de descarboxilación, piruvato, se reducen a L-malato y L-lactato respectivamente, utilizando como coenzima NADH.



La cantidad de NADH oxidado en las reacciones anteriores, es estequiométrico con la cantidad de citrato presente en la muestra analizada. Para evaluar la cantidad de  $\text{NAD}^+$  generado, se realiza la determinación de la absorbancia de esta coenzima a 334 nm.

### Reactivos:

Utilizaremos un equipo comercial para la determinación de ácido cítrico, el cual incluye tres recipientes:

Recipiente 1: buffer glicil-glicina; pH 7,8; L-malato deshidrogenasa, aprox. 136 U; L-lactato deshidrogenasa, aprox. 280 U; NADH.

Recipiente 2: 50 mg de citrato liasa liofilizada, aprox. 12 U.

Recipiente 3: Solución estándar de ácido cítrico para control del ensayo.

**Técnica**

En tubos de ensayo rotulados realizar lo siguiente:

	Blanco	Muestra
Solución 1 (µl)	250	250
Muestra (µ)	-----	50
Agua bidestilada (µl)	500	500
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia (Absorbancia 1). Luego agregar:		
Solución 2 (µl)	5	5
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia (Absorbancia 2).		

**Cálculo de resultados**

Determinar la diferencia de absorbancias (A1-A2) para el blanco y las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

Para calcular la concentración de ácido cítrico en cada una de las muestras ensayadas utilizar la siguiente ecuación general:

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volumen final (ml) (0,755 ml)

v = volumen de muestra (ml) (0,05 ml)

PM = peso molecular de la sustancia a ensayar (g/mol) (192,21 g/mol)

d = paso de luz (cm) (1 cm)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del NADH a 340nm: 6.3 (l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>) (6,3 mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>).



**BIBLIOGRAFÍA**

- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. Omega, 4<sup>ta</sup> ed., Barcelona (2005). Cap. 14-15.
- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8<sup>va</sup> ed., Bs. As. (2006). Cap.11.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2<sup>da</sup> ed. Acribia S.A. España (2000), Cap.6.
- Método UV para la determinación de ácido cítrico en alimentos y otros materiales. Roche, inserto-BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM. Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis

---

**TRABAJO PRÁCTICO LABORATORIO N° 5**  
**METABOLISMO DE LÍPIDOS**  
**SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

**OBJETIVOS**

- Conocer la técnica de cromatografía en capa fina como método sencillo y reproducible para la separación de componentes lipídicos.
- Analizar la composición lipídica de un extracto obtenido a partir de tejido de origen animal.
- Aplicar el método cromatográfico a la identificación de los lípidos extraídos.

**INTRODUCCIÓN**

Los lípidos comprenden una amplia variedad de compuestos químicos, tales como grasas neutras o triglicéridos, ácidos grasos y sus derivados, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y carotenos. A pesar de las diferencias estructurales, los lípidos poseen en común la propiedad de ser solubles en solventes orgánicos como cloroformo, éter, alcohol, acetona, etc., de allí que puedan extraerse de los tejidos animales o vegetales por tratamiento con estos solventes.

Los lípidos del organismo se hallan en un estado dinámico produciéndose constantemente variaciones en su composición que van a depender del metabolismo celular. El hígado cumple un rol relevante en el metabolismo de los lípidos siendo el órgano fundamental para: 1. Oxidación de los lípidos; 2. Síntesis de ácidos grasos; 3. Biosíntesis de cuerpos cetónicos; 4. Metabolismo de las lipoproteínas; 5. Síntesis del colesterol

El estudio de los lípidos es de interés biológico debido a que los mismos cumplen funciones variadas, entre las que podemos mencionar:

- **Reserva energética.** Los lípidos de depósito se encuentran principalmente en el tejido adiposo y en el que rodea a algunos órganos. Solo los triacilglicéridos pueden ser almacenados en grandes cantidades. Además, estos lípidos pueden actuar como aislantes térmicos y servir de cubierta protectora o sostén de órganos.
  - **Función estructural.** Forman las bicapas lipídicas de las membranas, por ejemplo: los fosfolípidos y esfingolípidos.
  - **Función biocatalizadora.** En este papel los lípidos favorecen o facilitan las reacciones químicas que se producen en los seres vivos. Cumplen esta función las vitaminas lipídicas, las hormonas esteroideas y las prostaglandinas.
  - **Función transportadora.** La digestión de los lípidos es favorecida a nivel intestinal, gracias a la formación de micelas en las que intervienen los ácidos biliares. Por otra parte, una vez que los lípidos de los alimentos son absorbidos en el tubo digestivo, las lipoproteínas son estructuras que permiten el transporte de los mismos en el torrente sanguíneo y linfático.
-

La **cromatografía** es un método físico de separación que permite la caracterización de mezclas complejas. Los diferentes tipos de cromatografía se basan en el principio de retención selectivo, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes, gracias a la utilización de sustancias “patrones”.

Entre los diferentes tipos de cromatografías, podemos mencionar la cromatografía plana, en la cual la fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o un papel. Las principales técnicas de cromatografía plana incluyen:

- Cromatografía en papel y cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna, y de acuerdo al fluido utilizado como fase móvil se distinguen la cromatografía de líquidos, la cromatografía de gases y la cromatografía de fluidos supercríticos.

**La cromatografía en capa fina** (TLC del inglés *thin layer chromatography*) se fundamenta en el reparto de cada compuesto entre una fase móvil y una fase estacionaria. El reparto se produce sobre la fase estacionaria, que tiende a retener el compuesto por adsorción. La fase móvil discurre a través de la fase estacionaria y tiende a arrastrarlo (desorción). Los componentes de la mezcla se separan porque responden de forma distinta a las fuerzas de adsorción/desorción. En la TLC la fase estacionaria utilizada frecuentemente es sílica gel y la fase móvil una mezcla de disolventes (eluyente). Cada compuesto migra a una distancia característica en función de su polaridad que le hace identificable al compararlo con patrones. Los patrones que más comúnmente se suelen utilizar para analizar lípidos son: 1) fosfatidilcolina (PL), 2) colesterol (CL), 3) trioleína (TG); y 4) oleato de colesterol (CE).

En la actualidad, la cromatografía ha alcanzado tal nivel de fineza y especialización que cada uno de sus tipos constituyen herramientas imprescindibles en las áreas de la ciencia y la tecnología, en la industria química, farmacéutica, cosmética, en estudios ambientales, en la clínica, en alimentos, etc.

## **DETERMINACION DE LA COMPOSICION LIPIDICA EN HÍGADO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA**

En el presente trabajo práctico de laboratorio realizaremos la técnica de cromatografía en capa delgada para determinar la composición lipídica de un tejido animal, utilizando mezclas de solventes orgánicos apolares (cloroformo, benceno u otros) y de mayor polaridad (metanol, etanol) que solubilizan los lípidos presentes y permite aislarlos del resto de los componentes tisulares.

### **PROCEDIMIENTO**

- **Muestra:** extracto lipídico de hígado de rata. Para obtener este extracto, obtendremos tejido hepático a partir del animal, pesaremos 0,2 g de tejido hepático y lo colocaremos en pequeños trozos en un tubo cónico de 50 ml.

Agregaremos la mezcla de extracción de lípidos (cloroformo: metanol; 2:1. 20 ml de mezcla/1g de tejido). Mezclar enérgicamente el tubo (con vórtex) y taparlo con papel film y papel metalizado. Conservar a 4°C por un período no menor a 24 h. Centrifugar la mezcla a 3000 rpm, durante 10 minutos. Colocar el extracto lipídico resultante (sobrenadante) en un vial de vidrio previamente tarado y limpio y llevar a secar bajo corriente de Nitrógeno. Por diferencia de pesada se obtienen los mg de lípidos en peso seco.

### Cromatografía en Capa Fina

- Reactivos:

- Solvente de corrida: n-hexano-----80 ml  
Éter etílico-----20 ml  
Ac. Acético -----1 ml
- Placa de sílica gel G, de 20 x 20 cm y 0,5 mm de espesor.
- Testigos: Trioleína (TG) 3mg/ml disuelta en cloroformo  
Colesterol
- yodo metálico.

- Muestra a sembrar:

El extracto seco obtenido del paso anterior, se retoma en 700 µl de hexano.

➤ Procedimiento cromatográfico:

**a) Activación, siembra y corrida**

- **Activación de la placa de sílica gel:** colocar la placa en estufa a 100°C durante 1 hora y dejar enfriar antes de sembrar la muestra.
- **Siembra:** aplicar la muestra (200 µl) en la línea de siembra (a 2 cm del borde inferior) de la placa de sílica gel G activada. En paralelo sembrar los testigos correspondientes: 20 µl de trioleína y 50 µl del testigo de colesterol

Nota: La muestra se siembra por duplicado en bandas de 1,5 cm aproximadamente.

- **Corrida:** colocar la placa en la cuba previamente saturada con el solvente de corrida. Retirar la placa de la cuba una vez que el frente del solvente se encuentre próximo a 3cm del borde superior. Tiempo de corrida aproximado: 20 min. (Ver figura 1). Dejar secar la placa a temperatura ambiente.

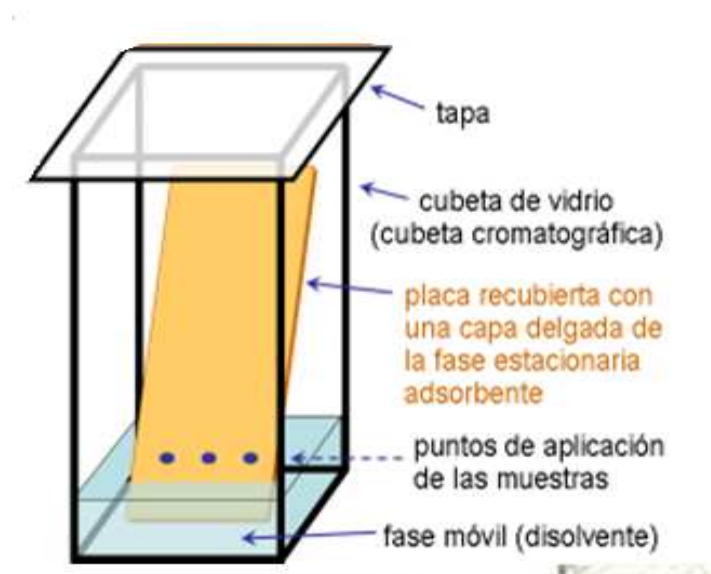


Figura 1. Cuba para cromatografía en capa fina

**b) Revelado**

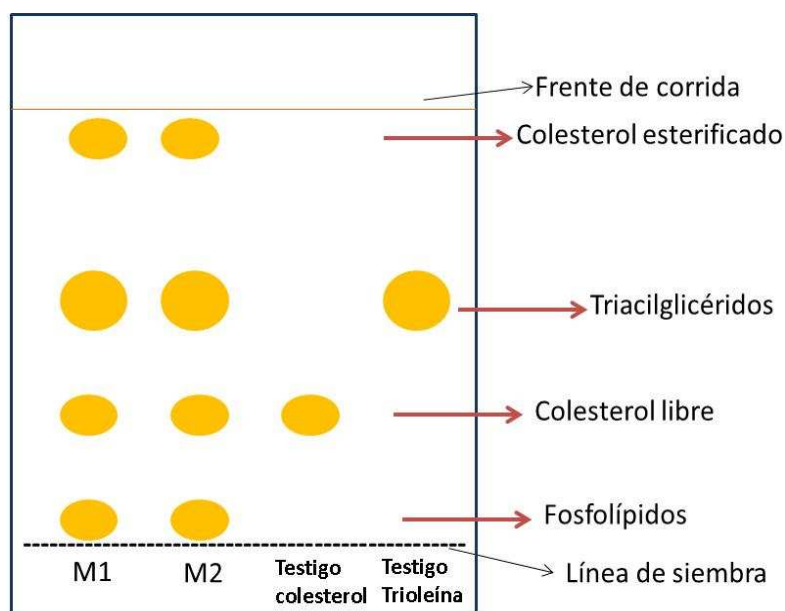
Evaporado por completo el solvente de la placa, las bandas se revelan con yodo.

Procedimiento:

- Colocar la placa, lo más vertical posible, en la cuba de revelado.
- Calentar en un recipiente granas de yodo metálico hasta la emisión de vapores violetas.
- Ubicar rápidamente el recipiente en un costado de la cuba, sin tocar la placa.
- Tapar la cuba.

Al momento de observar las bandas coloreadas (ver esquema 2):

- Retirar la placa de la cuba
- Delimitar las bandas con la punta de una aguja o puntas plásticas (tips).
- Raspar cuidadosamente las bandas delimitadas cuando la coloración desaparezca por completo.
- Recolectar en tubos adecuados la sílice del raspado para posteriores determinaciones colorimétricas.



Esquema 2. Bandas obtenidas después de la tinción con vapores de yodo

### ¡Atención!

Por manipulación de solventes orgánicos y emisión de vapores se debe trabajar bajo campana, utilizar máscara adecuada y guantes.

### BIBLIOGRAFIA

- Anzulovich, Ana Cecilia. 1998. Rol de la vitamina A en el metabolismo de los lípidos hepáticos. Trabajo de tesis doctoral. UNSL. Área de Química Biológica.
- Blanco Antonio. 2006. Química Biológica. 8va. Edición.
- Jordi Folch, M. Lees, T and G. H. Sloane Stanley. 1956. SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.
- Luis, Bravo T; Sebastián, Cabrera F; Leandro, Cádiz N; Camila, Cajas D. Evaluación química de los lípidos en los alimentos. Métodos actuales, características y fundamentos. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- Romero, A. 2002. Cromatografía cursos de Métodos. Instituto de Biotecnología UNAM. México.